

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

LARISSA BITTENCOURT

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE DIFERENTES COORTES
DEMOGRÁFICAS EM POPULAÇÕES DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. NO SUL DO
BRASIL**

LAGES

2021

LARISSA BITTENCOURT

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE DIFERENTES COORTES
DEMOGRÁFICAS EM POPULAÇÕES DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. NO SUL DO
BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal, Área de Concentração: Melhoramento e Recursos Genéticos.

Orientador: Dr. Adelar Mantovani

LAGES

2021

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

Bittencourt, Larissa

Diversidade e estrutura genética de diferentes coortes
demográficas em populações de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. no sul
do Brasil / Larissa Bittencourt. -- 2021.

115 p.

Orientador: Adelar Mantovani

Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Produção Vegetal, Lages, 2021.

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 em
Produção Vegetal. III. Título.

LARISSA BITTENCOURT

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE DIFERENTES COORTES
DEMOGRÁFICAS EM POPULAÇÕES DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. NO SUL DO
BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal, Área de Concentração: Melhoramento e Recursos Genéticos.

BANCA EXAMINADORA

Membros:

(Dr. Adelar Mantovani)

UDESC-CAV

(Dr. Newton Clóvis Freitas da Costa)

UDESC-CAV

(Dr. Marcio Carlos Navroski)

UDESC-CAV

(Dr. Ricardo Bittencourt)

FURB

(Dr. Valdir Marcos Stefenon)

UFSC

Lages, 30 de Julho de 2021.

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer agradecimento, quero fazer uma pequena citação da Lei da Mente (Buda), que faz muito sentido para mim, pois, ela é implacável, aquilo que você pensa você cria, aquilo que você sente você atrai, e aquilo que você acredita torna-se realidade. E desde o início da minha vida acadêmica eu acreditava que em algum momento este título de doutora iria ser realidade na minha vida. E só eu sei de todas as batalhas, fases, dificuldades, decepções, alegrias, prazeres e conquistas que tive até chegar neste momento.

E sei também que não conseguiria nada disso se não fosse todo o apoio que sempre recebi da minha família e amigos, por isso, gostaria de iniciar agradecendo imensamente aos meus pais Aida T. Bittencourt e Cesar R. Bittencourt, e ao meu irmão Julio Cesar Bittencourt por todo apoio e confiança depositados em mim, por todo amor, por toda dedicação em estarem sempre ao meu lado, muito obrigada, eu amo vocês.

Também agradeço a todos meus amigos de coração, que não preciso citar nomes, pois eles sabem bem, por todo apoio, amizade, amor, por estarem sempre ao meu lado, na alegria e na tristeza, que mesmo distantes sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado em todas as decisões tomadas, com muito carinho, com certeza vocês todos são muito importantes.

Agradeço também a todas as pessoas incríveis que conheci desde o início do doutorado, em especial, a Franciele Fernandes por me aturar e estar sempre do meu lado, mesmo muitas vezes não me entendendo. A Dahise Brilinger por todo apoio sempre, carinho, risadas, por me entender e muitas vezes fazer as batalhas serem mais fáceis de enfrentar. A Catieli Redin por simplesmente tudo, por me mostrar que posso ser muito mais. A Gesieli Buba por todos os momentos compartilhados e ensinamentos. A Camila Cigel por cada risada, cada abraço e palavra de conforto mesmo às vezes uma sendo mais indecisa que a outra sobre qualquer coisa. De todo meu coração agradeço ao Tiago Miqueloto por todo apoio, por todo carinho, conversas, ensinamentos, por sempre me compreender e me ouvir em todos os momentos. Ao Douglas Trautmann pela amizade de sempre, por todo apoio durante os trabalhos de campo e de laboratório, que com certeza sem ele não teria conseguido. A Débora Trautmann por todos os momentos de alegria e força e por aturar muitas vezes as diversas discussões entre o Douglas e eu e os vários dias de trabalho e campo.

Agradeço ao professor orientador Adelar Mantovani, por aceitar o desafio de me orientar, por todo ensinamento, com certeza aprendi muito com o senhor e o admiro muito.

Agradeço a todos os proprietários e gestores das áreas de estudo, pela disponibilidade e atenção dispensada nos dias de coleta.

Agradeço a Universidade do Estado de Santa Catarina pelo ensino de qualidade e gratuito.

Agradeço a CAPES e FAPESC pela disponibilidade da Bolsa de estudo, que com certeza sem ela não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço a todos aqueles que não foram citados em nomes, mas que com certeza foram muito importantes, por todo apoio de sempre.

Por fim, gostaria de encerrar agradecendo novamente a todos aqueles que participaram e contribuíram de alguma forma para que esse momento fosse possível. E encerro citando uma frase de Marthin Luther King:

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

Gratidão





“Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos olhos daqueles que não sabem voar.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Ilex paraguariensis A. St. Hil. conhecida como erva-mate, é uma espécie de grande importância social, cultural, ambiental e econômica no Brasil, Argentina e Paraguai. A fragmentação florestal pode ocasionar perda de diversidade genética, além de poder causar limitações nos níveis de fluxo gênico entre as populações, e consequentemente a redução na capacidade adaptativa da espécie. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar a diversidade, estrutura genética e fluxo gênico histórico e contemporâneo de *Ilex paraguariensis* em remanescentes florestais nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com o uso de marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie. O presente estudo foi particionado em dois capítulos, sendo que no capítulo I, estão apresentadas informações referentes à diversidade, estrutura genética e fluxo gênico histórico de seis populações de indivíduos adultos e regenerantes de *I. paraguariensis*; e no capítulo II, informações referentes à diversidade, estrutura genética e fluxo gênico contemporâneo de duas populações de indivíduos adultos, regenerantes e plântulas de *I. paraguariensis*. Foi realizada a coleta de amostras foliares dos indivíduos nos remanescentes (Floresta Nacional de Chapecó, Floresta Nacional de Três Barras, Parque Municipal Teixeira Soares, Complexo Serra da Farofa, e propriedades particulares nos municípios de: Ilópolis – RS, e Lacerdópolis – SC). Foram coletados frutos das matrizes (quando presentes), as plântulas foram obtidas após estratificação e germinação das sementes. De maneira geral para as populações foi observada a presença de alelos raros (freq. $\leq 5\%$) e exclusivos. Os índices de diversidade foram significativos e diferentes de zero, sugerindo desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg. A distribuição da diversidade genética foi menor entre as populações do que dentro, seguindo o padrão identificado por outros trabalhos realizados com a espécie. Não há correlação entre a divergência genética e a distância geográfica para as populações estudadas. Em geral, os resultados obtidos evidenciam a manutenção da diversidade genética presente em *I. paraguariensis* nas áreas estudadas ao longo das gerações. Recomenda-se a conservação de fragmentos de tamanho maior, e se possível com ligações entre fragmentos, para manutenção da variabilidade genética. Para trabalhos futuros recomenda-se a realização de estudos comparativos com mais eventos reprodutivos, e a coleta de um número maior de indivíduos, para maior representatividade da diversidade genética da espécie.

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

ABSTRACT

Ilex paraguariensis A. St. Hil. known as yerba mate, is a species of great social, cultural, environmental and economic importance in Brazil, Argentina and Paraguay. Forest fragmentation can cause loss of genetic diversity, in addition to limiting the levels of gene flow between populations, and consequently reducing the adaptive capacity of the species. Thus, the objective of this work was to evaluate and characterize the diversity, genetic structure and historical and contemporary gene flow of *Ilex paraguariensis* in forest remnants in the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, using microsatellite markers developed for the species. The present study was divided into two chapters, and in chapter I, information regarding the diversity, genetic structure and historical gene flow of six populations of adult and regenerating individuals of *I. paraguariensis* are presented; and in chapter II, information regarding the diversity, genetic structure and contemporary gene flow of two populations of adults, regenerating individuals and seedlings of *I. paraguariensis*. Leaf samples were collected from individuals in the remnants (Chapecó National Forest, Três Barras National Forest, Teixeira Soares Municipal Park, Serra da Farofa Complex, and private properties in the municipalities of: Ilópolis – RS, and Lacerdópolis – SC). Fruits were collected from the mother trees (when present); the seedlings were obtained after seed's stratification and germination. In general, for the populations, the presence of rare (freq. $\leq 5\%$) and exclusive alleles was observed. The diversity indexes were significant and different from zero, suggesting deviation in the Hardy-Weinberg equilibrium. The distribution of genetic diversity was smaller among populations than within, following the pattern identified by other studies carried out with the species. There is no correlation between genetic divergence and geographic distance for the populations studied. In general, the results obtained show the maintenance of the genetic diversity present in *I. paraguariensis* in the studied areas over the generations. It is recommended to conserve larger fragments, and if possible with links between fragments, to maintain genetic variability. For future works, it is recommended to carry out comparative studies with more reproductive events, and to collect a larger number of individuals, for greater representation of the genetic diversity of the species.

Keywords: Microsatellite markers. Yerba mate. Genetic variability. Gene flow. Population genetics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Perfil esquemático da Floresta Ombrófila Mista com a representação das formações que são encontradas no país.....24
- Figura 2 – Esquema ilustrativo da amplificação de fragmentos de DNA por meio de PCR 32
- Figura 3 – Folhas de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. com diferentes morfotipos35
- Figura 4 – Inflorescências e flores de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (A) inflorescências masculinas; (B) inflorescências femininas; (C) flor masculina, com destaque para as anteras desenvolvidas; (D) flor feminina, destaque para o ovário bem desenvolvido36
- Figura 5 – Áreas de ocorrência confirmadas da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. no Brasil (lado esquerdo). Classificação climática do Brasil segundo Köppen (lado direito)38
- Figura 6 – Disposição geográfica dos remanescentes florestais onde foram realizadas as coletas de material botânico de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. nas Unidades de Conservação (UC) e Propriedades Particulares (PP). Em que: (1) Floresta Nacional de Chapecó; (2) Parque Natural Municipal Teixeira Soares; (3) Propriedade Particular no município de Ilópolis – RS; (4) Floresta Nacional de Três Barras; (5) Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual Complexo Serra da Farofa; (6) Propriedade Particular no município de Lacerdópolis – SC43
- Figura 7 – Indivíduos regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. no Parque Natural Municipal Mata do Rio Uruguai Teixeira Soares, em áreas com maior abertura do dossel, com abundância de regenerantes e ocorrência em aglomerados.....46
- Figura 8 – Indivíduos regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na Floresta Nacional de Chapecó, em áreas com maior incidência de luminosidade e com sub-bosque pouco desenvolvido, observação para a ocorrência de gramíneas e taquaras em final de ciclo47
- Figura 9 – Indivíduos regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na Floresta Nacional de Três Barras, em áreas com maior incidência de luminosidade e sub-bosque menos desenvolvido49

Figura 10 – Indivíduos regenerantes de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil. na Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual Complexo Serra da Farofa – Fazenda das Nascentes, em áreas com maior incidência de luminosidade e umidade, com destaque para indivíduos ocorrentes na beira de córregos	50
Figura 11 – Indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil. em propriedade particular em Ilópolis – RS. (A) área de sub-bosque menos desenvolvido, com maior abertura e incidência de luminosidade. (B) indivíduo regenerante ocorrente na beira do curso d’água	52
Figura 12 – Porcentagens da variação molecular obtidos pela AMOVA para populações de indivíduos adultos e regenerantes de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil	64
Figura 13 – Correlação de Mantel entre o logaritmo natural da distância geográfica e o $F_{ST}/(1-F_{ST})$ par a par para as populações de indivíduos adultos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	67
Figura 14 – Correlação de Mantel entre o logaritmo natural da distância geográfica e o $F_{ST}/(1-F_{ST})$ par a par para as populações de indivíduos regenerantes de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	68
Figura 15 – Dendrograma de distâncias genéticas de Nei (1972) através do método UPGMA para as populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos adultos (A) e indivíduos regenerantes (R) de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	69
Figura 16 – Processo de obtenção das plântulas de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil., em que: (A) aspecto dos frutos coletados; (B) sementes separadas após estratificação com areia; (C) sementes colocadas para germinação; (D e E) plântulas separadas por matriz após germinação.....	84
Figura 17 – Frequência alélica nos locos microssatélites para as coortes de indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR)	87
Figura 18 – Porcentagens da variação molecular obtidos pela AMOVA para coortes de indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil nas áreas da FLONA de Chapecó e PNM Teixeira Soares	89

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Localização e descrição dos remanescentes florestais onde foram realizadas as coletas de material botânico de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.....42
- Tabela 2 – Distância geográfica* em km entre os remanescentes florestais onde foram realizadas as coletas de material botânico de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.43
- Tabela 3 – Denominação das populações de indivíduos adultos e regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. e coordenadas geográficas57
- Tabela 4 – Sequência dos iniciadores e motivo dos marcadores microssatélites de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. e condições da temperatura de anelamento na PCR .59
- Tabela 5 – Número de alelos encontrados em locos microssatélites em seis populações: PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL) de indivíduos adultos (A) e indivíduos regenerantes (R) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.62
- Tabela 6 – Frequência de alelos nulos presentes em cada loco microssatélite, pelo método Oosterhout et al. (2004), para as populações de indivíduos adultos e regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil..... 62
- Tabela 7 – Valores médios dos índices de diversidade genética para as populações PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL) de indivíduos adultos (A) e regenerantes (R) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. 63
- Tabela 8 – Estatísticas F de Wright calculadas para seis populações de indivíduos adultos e seis populações de indivíduos regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil...64
- Tabela 9 – Resultados da Análise Molecular da Variância (AMOVA) para seis populações de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos adultos e regenerantes, e entre grupos..... 65

Tabela 10 – Valores de divergência genética (F_{ST}) par a par, de seis populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos adultos (A) de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.....	66
Tabela 11 – Valores de divergência genética (F_{ST}) par a par, de seis populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos regenerantes (R) de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	66
Tabela 12 – Valores de divergência genética (F_{ST}) par a par por populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] adultas (A) e regenerantes (R) de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. na área	67
Tabela 13 – Matriz de distância genética de Nei (1972) (abaixo da diagonal principal) e matriz de identidade de Nei (1978) (acima da diagonal principal) para as populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos adultos (A) e regenerantes (R) de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	68
Tabela 14 – Matriz com valores de número de migrantes por geração (N_m) para as populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos adultos (A) e regenerantes (R) de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	70
Tabela 15 – Tamanho efetivo populacional (N_e) para valores de referência de 50, 500 e 1000 indivíduos para populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.....	70
Tabela 16 – Número de alelos encontrados em locos microssatélites em coortes de indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. na FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR)	85

Tabela 17 – Frequência de alelos nulos presentes em cada loco microssatélite, pelo método Oosterhout et al. (2004), para as coortes de indivíduos <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR)	85
Tabela 18 – Valores médios dos índices de diversidade genética para as coortes de indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR)	86
Tabela 19 – Frequência de alelos exclusivos para locos microssatélites em relação às coortes de indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR).....	88
Tabela 20 – Estatísticas F de Wright calculadas para os indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR).....	89
Tabela 21 – Resultados da Análise Molecular da Variância (AMOVA) para coortes de indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. na área da FLONA de Chapecó ..	89
Tabela 22 – Resultados da Análise Molecular da Variância (AMOVA) para coortes de indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. na área do PNM Teixeira Soares.	90
Tabela 23 – Resultados da Análise Molecular da Variância (AMOVA) para as coortes de indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. entre as áreas da FLONA de Chapecó e do PNM Teixeira Soares	90
Tabela 24 – Valores de divergência genética (F_{ST}) par a par para as coortes de indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. e áreas [FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR)].....	91
Tabela 25 – Matriz de distância genética de Nei (1972) (abaixo da diagonal principal) e matriz de identidade de Nei (1978) (acima da diagonal principal) para as coortes de indivíduos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR).....	92

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS FLORESTAIS.....	20
2.1.1	Alterações dos ecossistemas: Fragmentação florestal	20
2.1.2	Bioma Mata Atlântica	21
2.1.2.1	<i>Floresta Ombrófila Mista</i>	23
2.2	GENÉTICA DE POPULAÇÕES	26
2.2.1	Diversidade e Estrutura genética	27
2.2.2	Fluxo gênico	30
2.3	MARCADORES MOLECULARES: MICROSSATÉLITES	31
2.4	DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE: <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	34
2.4.1	Aspectos taxonômicos e botânicos	34
2.4.2	Distribuição natural	37
2.4.3	Usos e importância socioeconômica	38
2.4.4	Características genéticas	40
3	CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO	42
3.1	UNIDADES DE CONSERVAÇÃO	44
3.1.1	Parque Natural Municipal Mata do Rio Uruguai Teixeira Soares	45
3.1.2	Floresta Nacional de Chapecó	46
3.1.3	Floresta Nacional de Três Barras	48
3.1.4	Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual Complexo Serra da Farofa	49
3.2	PROPRIEDADES PARTICULARES	51
3.2.1	Propriedade Particular no município de Lacerdópolis – SC	51
3.2.2	Propriedade particular no município de Ilópolis – RS	52
4	CAPÍTULO I	53

	DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE INDÍVIDUOS ADULTOS E REGENERANTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	53
4.1	RESUMO	53
4.2	ABSTRACT	54
4.3	INTRODUÇÃO.....	55
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.4.1	Coleta do material vegetal	57
4.4.2	Isolamento e amplificação do DNA genômico	58
4.4.3	Análise de dados	60
4.5	RESULTADOS	61
4.6	DISCUSSÃO.....	71
4.7	CONCLUSÃO.....	78
5	CAPÍTULO II.....	79
	FLUXO GÊNICO ENTRE COORTES DE INDÍVIDUOS DE <i>Ilex</i> <i>paraguariensis</i> A. St. Hil. EM DOIS REMANESCENTES FLORESTAIS.....	79
5.1	RESUMO	79
5.2	ABSTRACT	80
5.3	INTRODUÇÃO.....	81
5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	83
5.5	RESULTADOS	84
5.6	DISCUSSÃO.....	92
5.7	CONCLUSÃO.....	96
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXO I.....	115

1 INTRODUÇÃO GERAL

O território brasileiro abriga a segunda maior área florestada e maior biodiversidade do mundo (CAMPANILLI; SCHAFFER, 2010; Ministério do Meio Ambiente - MMA, 2020). É inegável a importância das florestas e seus recursos naturais, pois, proporcionam inúmeros benefícios de forma geral, nos âmbitos, ambiental, econômico e social, como por exemplo, na absorção de gases como o CO₂ que auxilia na regulação climática, habitat para a flora e fauna, ecoturismo, fornecimento de sensação de bem-estar e lazer a população, entre tantos outros (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; ROSSI; SARTORETTO, 2014).

A exploração não controlada dos recursos ao longo dos anos, o processo de ocupação populacional acelerado e desordenado em todo o território brasileiro, somado com as alterações naturais, resulta em transformações na paisagem natural (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998; STEFFEN et al., 2011). As alterações antrópicas são as que merecem maior atenção, já que são as maiores responsáveis pela perda de biodiversidade dos ecossistemas, com o desmatamento e superexploração da floresta nativa (METZGER et al., 2009; SEOANE; SEBBENN; KAGEYAMA, 2005).

A consequência mais evidente destas alterações é a fragmentação florestal, que faz com que os remanescentes florestais sejam reduzidos e conseqüentemente fiquem isolados, o que interfere no equilíbrio e na dinâmica das florestas (CRUZ et al., 2018; SARMENTO; VILLELA, 2010). A fragmentação pode reduzir o habitat tanto da fauna como da flora (SHAFFER, 1981), alterando a composição das florestas, podendo causar perda de fluxo gênico, que pode ocasionar diferenciação genética das populações florestais nativas brasileiras (SEBBENN et al., 2011). Como já mencionado, a fragmentação florestal promove o isolamento das populações, fato que pode causar aumento na endogamia, ou seja, o aumento de cruzamentos entre indivíduos aparentados, e com isso, pode haver a redução da capacidade de evolução, e de adaptação das espécies (SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016), entre outras causas que são desfavoráveis, tanto ambientalmente, quanto para a economia e para as comunidades tradicionais que realizam extrativismo.

No Brasil uma das regiões que mais apresenta alterações é o Bioma Mata Atlântica, portanto, é incluído como um dos 34 *hotspots* de biodiversidade no cenário mundial (MITTERMEIER et al., 2004), ou seja, é um Bioma com prioridade de conservação. O Bioma abriga diversas espécies endêmicas (MYERS et al., 2000), e é considerado patrimônio natural, genético e cultural, por ser o segundo maior ecossistema do mundo em biodiversidade tem importância global (MMA, 2020; Secretária do Meio Ambiente - SEMA, 2009). Com um

histórico de exploração e transformações (ELIAS; PADILHA; SANTOS, 2016), atualmente é protegido pela Lei da Mata Atlântica (LEI nº 11.428/2006), para seu uso e conservação.

No Bioma Mata Atlântica o estado de Santa Catarina está inserido completamente, com cerca de 29% da cobertura florestal atualmente (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2020; VIBRANS et al., 2012), e o Rio Grande do Sul com distribuição predominante nas regiões norte e nordeste, com apenas 7,5% de remanescentes da cobertura original (CARGNIN et al., 2019), ambos estados com elevado grau de fragmentação.

Uma das formações florestais presentes no Bioma Mata atlântica é a Floresta Ombrófila Mista, caracterizada principalmente pela presença da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, fato que a faz também ser conhecida como Mata de araucárias (BERTOLDO; PAISANI; OLIVEIRA, 2014). Esta formação florestal tem elevada importância por abrigar espécies endêmicas, e espécies listadas como ameaçadas de extinção, além de espécies de interesse econômico, como a *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (KERSTEN; BORGO; GALVÃO, 2015; MARTINELLI; MORAES, 2013).

I. paraguariensis é conhecida popularmente como erva-mate, pertence à família Aquifoliaceae segundo o Sistema de Classificação Angiosperm Phylogeny Group (APG IV, 2016), e possui ampla distribuição natural na América do Sul. No Brasil tem ocorrência confirmada nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, com maior distribuição nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul (FLORA DO BRASIL, 2020; LORENZI, 2016).

É uma espécie com ampla utilização, principalmente como chás e bebidas estimulantes (SOUZA; LORENZI, 2019), também nas áreas de cosmetologia e uso medicinal (VALDUGA et al., 2016), bem como, ambiental, como por exemplo, em recomposição da vegetação em áreas degradadas (LORENZI, 2016), paisagismo e entre outros usos. Tem elevada importância social, cultural, ambiental e econômica, principalmente no sul do Brasil (BACKES; IRGANG, 2002; MARQUES; REIS; DENARDIN, 2019), integrando sistemas agroflorestais e colaborando na manutenção do pequeno produtor no meio rural (BRASIL, 2017; DUTRA; HANSEL; WENDLING, 2008).

A elevada demanda por matéria prima, proveniente da erva-mate, fez com que ocorresse um aumento no cultivo da espécie, em plantios comerciais e a exploração dos ervais nativos (DANIEL, 2009; RIGO et al., 2014), o que gerou um crescimento em programas de melhoramento para o cultivo da espécie (STURION; RESENDE, 2010). Estas melhorias, entretanto, são basicamente atreladas à qualidade do produto final, ou seja, volume de material foliar.

Dado o amplo uso e comercialização da erva-mate (MARQUES; REIS; DENARDIN, 2019), e o cenário atual de fragmentação dos remanescentes florestais (KUNZ et al., 2014), é necessário à ampliação de estudos sobre a diversidade e estrutura genética das populações, e como se dá a distribuição desta variabilidade, já que estudos com este viés são necessários para ter informações quanto ao atual estado de conservação genética das populações, dando subsidio de forma equilibrada para inferir quanto ao uso e a conservação dos recursos florestais, além de favorecer na manutenção desses fragmentos.

Muitos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de aumentar este conhecimento a respeito da *I. paraguariensis*, com o desenvolvimento de primers microssatélites para a espécie (PEREIRA et al., 2013), também comparações de populações em diferentes países (Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai) (CASCALES et al., 2014); entre regiões (MS, PR, SC, RS) (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000); no Planalto Norte Catarinense (MATTOS, 2015), no Paraná (WENDT et al., 2007). Estes trabalhos desenvolvidos são importantes e fornecem informações sobre a diversidade genética da espécie. Para ter maiores informações a cerca da real situação genética da espécie, são necessários mais estudos, com um número maior de populações e indivíduos coletados, em diferentes regiões.

Com isso, a fim de ampliar as áreas de avaliação e contribuir para o aumento de informações referentes às características genéticas da espécie, alguns trabalhos com a *I. paraguariensis* foram realizados pelo grupo de pesquisa Uso e Conservação de Recursos Florestais da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/CAV). Com análises da diversidade e estrutura genética em dez populações de indivíduos adultos (SILVA, 2019), o qual foi de extrema importância para continuidade e os resultados da presente tese. Além deste, este mesmo Grupo desenvolveu um trabalho mais aprofundado integrando dados demográficos e genéticos (STEDILLE, 2020).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar e caracterizar a diversidade genética, estrutura genética e fluxo gênico em populações e em diferentes coortes demográficas de *I. paraguariensis* localizadas em remanescentes florestais nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com a utilização de marcadores microssatélites.

Para tanto, o trabalho está dividido em dois capítulos:

- No capítulo I, estão apresentadas informações referentes à diversidade, estrutura genética e fluxo gênico histórico de seis populações de indivíduos adultos e regenerantes de *I. paraguariensis*;
- No capítulo II, informações referentes à diversidade, estrutura genética e fluxo gênico de duas populações de indivíduos adultos, regenerantes e plântulas de *I. paraguariensis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS FLORESTAIS

Em escala mundial segundo o Ministério do Meio Ambiente o Brasil abriga a segunda maior área florestada do mundo, com aproximadamente 61% do território nacional, além de ser o país detentor da maior biodiversidade do planeta. Portanto é importante a preservação dos recursos naturais para a sustentabilidade (CAMPANILLI; SCHAFFER, 2010).

Os benefícios que os recursos naturais proporcionam de maneira geral é indiscutível, entretanto, devido à elevada exploração desses recursos sem controle juntamente com ocorrências de distúrbios naturais, houve grandes alterações nos ecossistemas naturais ao longo das décadas (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998; PRIMACK; RODRIGUES, 2001; SEOANE; SEBBENN; KAGEYAMA, 2005).

No cenário atual, muitas são as discussões a respeito da exploração sustentável dos recursos, sendo um grande desafio conciliar o uso e a conservação das florestas, com isso, tem-se a necessidade cada vez maior da criação de políticas públicas, e também a produção de informações e aumento de conhecimento sobre os recursos florestais disponíveis em cada região, como por exemplo, a realização de inventários florestais (Serviço Florestal Brasileiro - SFB, 2018; VIBRANS et al., 2012), levantamentos fitossociológicos (BALBINOT et al., 2016; CHAVES et al., 2013; FARIAS et al., 1994), dinâmicas de populações (SALAMI et al., 2017), caracterizações florísticas e de estrutura de remanescentes florestais (KLAUBERG et al., 2010; LINGNER et al., 2015), levantamento de espécies raras (FONTANA; GASPER; SEVEGNANI, 2016), conservação, estrutura e diversidade genética de populações de espécies nativas (LAUTERJUNG et al., 2018; MANTOVANI; MORELLATO; REIS, 2006; MONTAGNA et al., 2012; MONTAGNA et al., 2018; ZECHINI et al., 2018), entre tantos outros estudos importantes para o uso e conservação dos recursos florestais.

2.1.1 Alterações dos ecossistemas: Fragmentação florestal

Diversas transformações vêm ocorrendo nos ecossistemas naturais, como mencionado anteriormente, o que é considerado uma das características para denominação do período atual como Antropoceno (STEFFEN et al., 2011). Essas alterações são ocasionadas por causas naturais e ou antrópicas, entretanto, a influência antrópica é a mais preocupante, como por exemplo, o crescimento populacional, a ocupação territorial pela população e a expansão das

atividades agropecuárias, pois muitas vezes esta influência é responsável por desmatamentos, superexploração das florestas nativas, e conseqüentemente a perda da biodiversidade desses ecossistemas (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998; METZGER et al., 2009; SEOANE; SEBBENN; KAGEYAMA, 2005).

A fragmentação florestal como o próprio nome já diz é a redução dos remanescentes florestais naturais em pedaços progressivamente menores, fazendo com que estes fragmentos fiquem isolados por áreas agrícolas, industriais ou urbanas (SARMENTO; VILLELA, 2010). Esta alteração causa um distúrbio no equilíbrio dinâmico das florestas, e atualmente é a mais evidente de origem antrópica (CRUZ et al., 2018; LONGHI et al., 2000; NASCIMENTO; LAURENCE, 2006; VIANA; PINHEIRO, 1998).

Devido à intensa modificação da paisagem, redução da área de habitat (SHAFFER, 1981), tem-se muitas vezes a mudança na composição e na diversidade genética, ocorrência de limitações na polinização, dispersão (SEBBENN et al., 2011) e capacidade de colonização das espécies (flora e fauna) no local (SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016). A redução de área também pode deixar os fragmentos vulneráveis à invasão de espécies exóticas (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A excessiva fragmentação florestal pode diminuir o tamanho efetivo da população, o que compromete a sustentabilidade destas populações (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998), podendo favorecer a estruturação das populações de algumas espécies (GOIS; FERREIRA; SILVA-MANN, 2018). Os efeitos causados pela fragmentação podem ocasionar o aumento da endogamia, ou seja, aumento nos cruzamentos entre indivíduos aparentados, o que, conseqüentemente pode resultar na redução da capacidade de evolução e adaptação das espécies (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998; SARMENTO; VILLELA, 2010; SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016), entre outras causas desfavoráveis.

Todos os fatores negativos, como alguns citados acima, causados pela fragmentação nos ecossistemas naturais, demonstram a importância da manutenção destes remanescentes florestais e a necessidade de conhecimento quanto ao seu estado de conservação (SILVA et al., 2012; KUNZ et al., 2014; SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016).

2.1.2 Bioma Mata Atlântica

A abundante biodiversidade existente no Brasil, segundo o Ministério do Meio Ambiente, faz com que o país seja a principal nação entre 17 países de maior biodiversidade. Esta diversidade está distribuída ao longo de todo território nacional e devido distintas

características, tem-se a formação de seis Biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal.

O termo Bioma tem como característica a uniformidade de um macroclima, de fitofisionomias vegetais, condições edáficas, ocorrência de fogo natural, altitudes, alagamentos, entre outros, conferindo funcionalidades peculiares, estrutura e uma ecologia própria de um espaço geográfico natural (COUTINHO, 2006).

O Bioma Mata Atlântica é considerado um patrimônio natural, genético e cultural, com importância global, por ser o segundo maior ecossistema do mundo em biodiversidade (MMA, 2020; SEMA, 2009) e que abriga diversas espécies endêmicas (MYERS et al., 2000). Tem elevada importância para o equilíbrio climático do país e na conservação dos recursos hídricos, além da sua importante participação no Produto Interno Bruto (PIB), com serviços ambientais tanto relacionados à produção (produtos madeireiros e não madeireiros), como ecoturismo, entre outros (SEMA, 2009). Entretanto, também é considerado um dos Biomas mais ameaçados (CAMPANILLI; SCHAFFER, 2010), com isso é indispensável o planejamento de seu uso e desenvolvimento sustentável.

A Mata Atlântica apresenta um cenário atual de muitas transformações, sendo resultado de um processo histórico de exploração, iniciado com a chegada dos portugueses ao Brasil. A ocupação territorial pela população, a exploração dos recursos madeireiros, conversão das áreas de floresta em campos cultivados, introdução de espécies exóticas invasoras, entre outros, também são causas das principais alterações no Bioma (ELIAS; PADILHA; SANTOS, 2016; NEGRINI et al., 2014).

A elevada riqueza ecológica, elevado grau de endemismo e níveis altos de exploração (desmatamentos) inclui o Bioma como um dos 34 *hotspots* de biodiversidade no cenário mundial (MITTERMEIER et al., 2004). Em 1988 o conceito *Hotspot* foi criado pelo ecólogo Norman Myers, para identificar áreas com prioridade de conservação, estas regiões são classificadas pelo número de espécies endêmicas e pelos níveis graves de perda de habitat.

Um dos benefícios do reconhecimento do Bioma Mata Atlântica como *hotspot* é o destaque a nível internacional, que proporciona publicidade ao Bioma, auxiliando na conscientização da população frente à necessidade de conservação da área, já que se for extinta grande parte da biodiversidade vai desaparecer (ELIAS; PADILHA; SANTOS, 2016).

O Bioma é protegido pela Lei nº 11.428/2006, conhecida como a Lei da Mata Atlântica, que visa “A conservação, a proteção, a regeneração e a utilização do Bioma Mata Atlântica, patrimônio nacional” (LEI nº 11.428/2006, Art. 1), regulamentada pelo Decreto nº 6.660/2008. Além de diversos projetos desenvolvidos por agências governamentais e ONGs

para conservação, como por exemplo, Fundo de Parceria para Ecossistemas Críticos (Critical Ecosystem Partnership Fund – CEPF), Fundo Nacional do Meio Ambiente (FNMA), Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira (PROBIO), entre outros, que visam investimentos substanciais de recursos para a proteção das áreas ameaçadas.

Na região sul do Brasil, o estado de Santa Catarina está completamente inserido no Bioma Mata Atlântica, e hoje restam cerca de 29% de cobertura florestal (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2020; VIBRANS et al., 2012), sendo que desta cobertura, menos de 5% se assemelha ao original. Segundo o relatório anual de atividades da fundação SOS Mata Atlântica o estado de Santa Catarina ocupa duas posições antagônicas, pois, ao mesmo tempo em que é considerado o estado que mais suprimiu a Mata Atlântica no período de 1985 a 2015, é também o terceiro estado que apresentou maior regeneração da mata no mesmo período (BALAZINA et al., 2017).

No Rio Grande do Sul a Mata Atlântica distribui-se predominantemente nas regiões norte e nordeste, sendo que a maior extensão do estado é de predomínio do Bioma Pampa (SFB, 2018). Atualmente no território gaúcho do Bioma Mata Atlântica restam somente 7,5% das áreas remanescentes, e estas apresentam em relação à cobertura original um alto grau de fragmentação (CARGNIN et al., 2019).

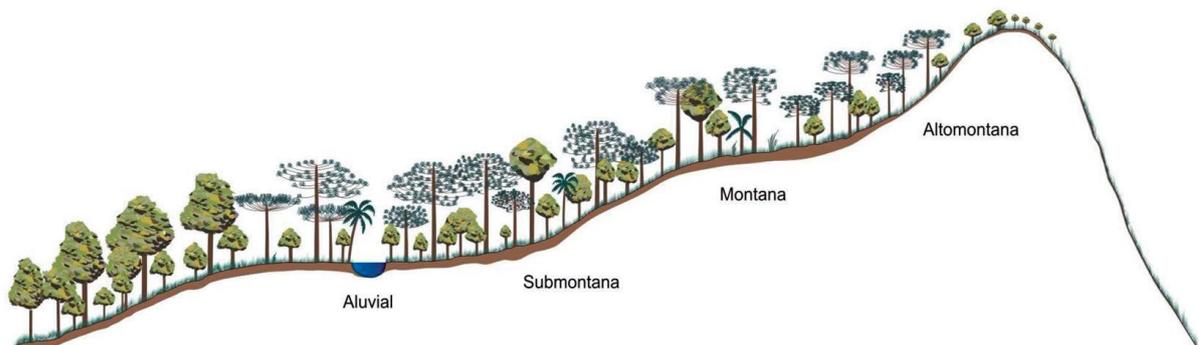
2.1.2.1 Floresta Ombrófila Mista

São consideradas dentro do Bioma Mata Atlântica segundo o Art. 2 da Lei nº 11.428/2006, as seguintes formações florestais: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Mata de Araucárias; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; e Floresta Estacional Decidual, bem como os manguezais, as vegetações de restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encraves florestais do Nordeste.

A Floresta Ombrófila Mista (FOM), popularmente conhecida como Mata de Araucárias, com diferentes denominações, como, pinhais, pinheiral, floresta com araucárias, entre outras (GUERRA et al., 2002; KERSTEN; BORGIO; GALVÃO, 2015; KLAUBERG et al., 2010), é caracterizada principalmente pela presença da *Araucaria angustifolia* que em associação com espécies de características próprias, resulta em agrupamentos de formas variadas, formando estágios sucessionais distintos (BERTOLDO; PAISANI; OLIVEIRA, 2014; SALAMI et al., 2017).

A distribuição geográfica dessa formação florestal é predominantemente no planalto meridional, com maior extensão nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, com agrupamentos menores em São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo, se estendendo até a Argentina e Paraguai (BACKES, 2009; MEYER et al., 2013a). Esta formação florestal é dividida em quatro subformações (Figura 1), sendo três considerando diferentes níveis de altitude: Submontana (de 30 até ± 400 m de altitude e latitude 24°S até 32°), Montana (de 400 até 1000 m de altitude quando latitude de 24°S até 32°S) e Alto-Montana (situada acima dos limites de altitude da formação Montana); e uma considerando a influência de cursos d'água: Aluvial (BACKES, 2009; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2019; KERSTEN; BORGO; GALVÃO, 2015).

Figura 1 – Perfil esquemático da Floresta Ombrófila Mista com a representação das formações que são encontradas no país



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2019).

Sua ocorrência é delimitada por regiões que apresentam clima temperado com chuvas regulares (MEYER et al., 2013b), baixas temperaturas, elevadas altitudes que vão de 200 m a extremo sul a 1500 m na Serra da Mantiqueira (MEYER et al., 2013a), e estações do ano relativamente definidas, com um misto de espécies angiospermas e gimnospermas. As famílias botânicas que se destacam são: Aquifoliace, Lauraceae, Meliaceae, Myrtaceae, Podocarpaceae, Salicaceae, entre outras; como também o número significativo de espécies epífitas, lianas, musgos e pteridófitas (BERTOLDO; PAISANI; OLIVEIRA, 2014; GASPER et al., 2013a; KERSTEN; BORGO; GALVÃO, 2015; MEYER et al., 2013b). Cabe ressaltar a importância da FOM, por abrigar espécies endêmicas, como por exemplo, espécies do gênero *Myrceugenia* (VIBRANS et al., 2013), e diversas espécies ameaçadas de extinção listadas no Livro Vermelho da flora do Brasil, como por exemplo, a própria *Araucaria angustifolia*, *Butia eriospatha*, *Dicksonia sellowiana*, *Ocotea odorifera*, *Ocotea porosa*; além de espécies

de interesse econômico, como por exemplo a *I. paraguariensis* (KERSTEN; BORGIO; GALVÃO, 2015; MARTINELLI; MORAES, 2013; SFB, 2018; VIBRANS et al., 2013).

As variações de altitude e latitude dada à extensão da FOM atribuem uma variação de clima considerável (BERTOLDO; PAISANI; OLIVEIRA, 2014; KERSTEN; BORGIO; GALVÃO, 2015). Uma junção de fatores ecológicos e biogeográficos aliado a diferentes históricos de ocupação (NEGRINI et al., 2014) conferem a esta unidade fitogeográfica, uma paisagem heterogênea, e mesmo que apresentando fisionomia similar, há muitas composições de espécies e estruturas físicas diferentes, bem como as dinâmicas florestais são diversas em diferentes localidades (CRUZ et al., 2018; KERSTEN; BORGIO; GALVÃO, 2015; SONEGO; BACKES; SOUZA, 2007).

Em razão deste histórico de ocupação territorial e desmatamentos, em função da intensa exploração dos recursos florestais principalmente madeireiro no passado, e a demanda por áreas agricultáveis, a FOM é configurada hoje, como um remanescente com pequenos fragmentos, isolados e com a composição alterada, com pouca representatividade da floresta original (HIGUCHI et al., 2012; GASPER et al., 2013b), sendo uma das tipologias mais ameaçadas do país (CARLUCCI et al., 2011).

Numericamente a FOM ocupava originalmente segundo Klein (1960) cerca de 200.000 km² no Brasil. No estado de Santa Catarina que a FOM recobria 45% do território, restam hoje 24,4% com raríssimos remanescentes de florestas primárias, sendo coberta basicamente por florestas secundárias, em estágio médio e avançado (SEVEGNANI et al., 2013). Com o registro da presença de 43% das espécies de toda a FOM no Brasil e 22,7% de todas as espécies registradas para o estado (GASPER et al., 2013b), destaca Santa Catarina como um abrigo importante da biodiversidade. No Rio Grande do Sul tem-se uma paisagem fragmentada, dominada por fisionomia agrícola, um estudo sobre a cobertura vegetal no estado apresentou a redução de aproximadamente mais de 50% da cobertura da FOM no estado em relação a original, restando em torno de 12,84%, refletindo um alto grau de antropização (CORDEIRO; HASENACK, 2009). Situação que é agravada pelas informações atuais de cobertura, pois, segundo os dados do Inventário Florestal Nacional do Rio Grande do Sul (2018) e do IBGE (2019), houve diminuição de 9% na área coberta pela FOM.

Apesar de todo isolamento, redução e perturbações, estes remanescentes desempenham funções ambientais de grande importância, como a ligação entre fragmentos florestais, manutenção dos cursos de água, proteção do solo, sequestro de carbono atmosférico que mitiga os efeitos negativos das mudanças climáticas (HIGUCHI et al., 2012; SALAMI et al., 2017). Esses dados evidenciam a necessidade de conservação e preservação desta

fisionomia florestal, principalmente pelos fatores ecológicos, mas também pela importância social e econômica para as comunidades do entorno (SFB, 2018; VIBRASN et al., 2012).

2.2 GENÉTICA DE POPULAÇÕES

De maneira simples e resumida uma população pode ser definida como um grupo de organismos de uma mesma espécie. Para a genética de populações de espécies florestais é necessário maior especificação, portanto, população aqui se refere a um conjunto de indivíduos da mesma espécie que vivem em uma área geográfica suficiente para que os indivíduos tenham chances iguais de acasalamento ao acaso (HARTL; CLARK, 2010; WHITE; ADAMS; NEALE, 2007).

A genética de populações fornece informações da quantidade de variação genética existente nas populações e como se dá a distribuição desta variação genética, além de analisar as forças que controlam essa variação (GRIFFITHS et al., 2017). A variabilidade é transmitida de geração em geração, e com a ação dos fatores mutação, migração, deriva genética e seleção natural a composição genética de uma população pode ser alterada (SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016).

As proporções de genótipos e de genes (alelos) dentro de um grupo de indivíduos, ou seja, as frequências genotípicas e gênicas deste grupo é o que descreve a composição genética desta população. As frequências gênicas ou 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 (RAMALHO et al., 2012).

Para a compreensão teórica das características genéticas utiliza-se o princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, que descreve a relação entre as frequências genotípicas e alélicas (GRIFFITHS et al., 2017) expressando a dinâmica dos genes e o equilíbrio da população. Para o entendimento e fazer previsões é utilizado um modelo matemático simples, a lei de Hardy-Weinberg tem alguns pressupostos para que as frequências alélicas e genotípicas permaneçam constantes de uma geração para outra, sendo estes: a população deve ser de tamanho relativamente grande, de indivíduos diplóides, de reprodução sexuada, com cruzamentos aleatórios, em que, todos os genótipos tenham igual viabilidade e fertilidade, e a ausência dos fatores evolutivos (mutação, migração, seleção e deriva genética) (GRIFFITHS et al., 2017; HARTL; CLARK, 2010). Uma geração de cruzamentos ao acaso é necessária para reestabelecer o equilíbrio caso haja distúrbio (PIRES et al., 2011; WRIGHT, 1951).

As comparações entre populações são realizadas utilizando a 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 (HAMILTON, 2009; HARTL; CLARK, 2010; PIRES et al., 2011; RAMALHO et al., 2012).

Os estudos e pesquisas na área da genética de populações florestais têm crescido, principalmente devido à fragmentação como mencionado anteriormente. Populações com tamanho reduzido, são mais suscetíveis aos efeitos dos fatores evolutivos (GRIFFITHS et al., 2017; KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998; VIEGAS et al., 2011), o que pode ocasionar o isolamento espacial das populações. O sucesso reprodutivo das espécies pode ser prejudicado, pois, pode haver a diminuição de agentes polinizadores e dispersores nas áreas, que conseqüentemente pode causar a redução da variabilidade genética ao longo do tempo, afetando a sobrevivência e vigor das espécies (GOIS; FERREIRA; SILVA-MANN, 2018; SEBBENN et al., 2011).

2.2.1 Diversidade e Estrutura genética

A variação genética existente nas populações florestais é resultado de processos evolutivos, que proporcionaram indivíduos adaptados a cada ambiente (PIRES et al., 2011). Estudos realizados sobre diversidade e estrutura genética nas populações permitem a obtenção de conhecimento da organização e distribuição da variabilidade entre e dentro das populações. A obtenção destas informações é importante para a elaboração de melhores estratégias para a conservação e uso das espécies (PIRES et al., 2011; REIS et al., 2012).

A diversidade genética refere-se à quantidade de variação dos genes existente em uma população de uma dada espécie. Caracterizada por meio de um conjunto de parâmetros, como, número de alelos por loco, número de alelos efetivos, raros, heterozigosidade observada e esperada, índice de fixação, tamanho efetivo populacional, entre outros (HAMILTON, 2009; HARTL; CLARK, 2010; WHITE; ADAMS; NEALE, 2007; SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016). Estes parâmetros fornecem informações importantes, como por exemplo, se existe muita ou pouca variação que pode ser transmitida para as próximas gerações, se ocorreu perda em função de processos exploratórios, etc. Pode-se estabelecer a situação em que se encontra uma espécie (diversidade genética, fluxo genético, estruturação genética,

capacidade adaptativa, entre outros) ao realizar avaliações em diversas populações desta espécie em uma determinada abrangência geográfica (REIS et al., 2012).

A forma efetiva de gerar variação é a mutação, e embora seja um evento raro e aleatório, pode contribuir para a variação genética desde que haja conjuntamente ações de outros fatores como seleção ou deriva. Outra maneira que pode adicionar variação a uma população é a migração, com a entrada e ou saída de alelos ou indivíduos, limitando a divergência genética entre populações, e conseqüentemente causando mistura genética (GRIFFITHS et al., 2017; PIRES et al. 2011).

A continuação da variação genética nas populações é controlada principalmente por duas forças, a deriva genética e a seleção natural. A deriva sendo uma força aleatória pode levar a perda ou fixação de um alelo, agindo com maior intensidade em populações pequenas. A seleção natural atua no direcionamento das alterações nas frequências alélicas de uma população ao longo do tempo, em que os indivíduos que possuem os alelos com maior adaptabilidade aumentaram sua frequência podendo se fixar, enquanto alelos deletérios serão excluídos (GRIFFITHS et al., 2017).

Uma explicação para a manutenção dos altos níveis de variação genética nas populações é o equilíbrio da atuação dos fatores evolutivos opostos, ou seja, mutação e migração *versus* deriva e seleção (GRIFFITHS et al., 2017).

Estrutura genética corresponde ao modo que a diversidade está distribuída entre e dentro das populações. A abordagem utilizada para a caracterização desta distribuição pode ser pela análise de diversidade gênica em populações subdivididas proposta por Nei (1977); por coeficientes de coancestralidade (COCKERHAM, 1969; LOISELLE et al., 1995); e a mais antiga e utilizada, estatísticas F proposta por Wright (1951), 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}) (HARTL; CLARK, 2010; WHITE; ADAMS; NEALE, 2007).

As informações fornecidas por estas abordagens são importantes para o entendimento dos processos biológicos e qual a situação da diferenciação genética e a manutenção da variabilidade nas populações, além de ajudar a definir estratégias para o uso e conservação das espécies (AULER et al., 2002; PIRES et al., 2011; SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016).

A distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações está ligada ao modo de reprodução das espécies e as síndromes de polinização e dispersão, além da

influência dos fatores ambientais (SEBBENN et al., 2011). Espécies de fecundação cruzada possuem maior potencial de movimentação de genes, portanto, são características por apresentarem maior diversidade genética dentro da população do que entre (AULER et al., 2002; HAMRICK; GODT, 1989; STEFENON; GAILING; FINKELDEY, 2007). Contudo, também depende da localização geográfica, o padrão de distribuição da espécie, tipo de habitat, tamanho dos fragmentos, entre outros (COSTA et al., 2015; MONTAGNA et al., 2012; MORAES; KAGEYAMA; SEBBENN, 2005; SHIMIZU; JAEGER; SOPCHAKI, 2000).

Com o cenário atual de fragmentação florestal, pode ocorrer a indesejada estruturação populacional devido ao isolamento, ou seja, um aumento no número de indivíduos homozigotos na população (GRIFFITHS et al., 2017), podendo ser prejudicial para a capacidade adaptativa da espécie em determinada região.

Estudos na área da genética de populações têm ganhado eficiência com a utilização de tecnologias, como os marcadores moleculares, para exemplificar, podemos citar alguns estudos: Com marcadores isoenzimáticos, na caracterização da estrutura genética de populações de *Araucaria angustifolia* (AULER et al., 2002); identificação da diversidade genética, deriva genética e sistemas de cruzamentos mistos em pequenas subpopulações de *Dyckia ibiramensis* (HMELJEVSKI et al., 2011); uma integração de estudos demográficos e genéticos em *Ocotea catharinensis* para a conservação da espécie (MONTAGNA et al., 2018); estudo em populações de *I. paraguariensis* visando a conservação pelo uso (MATTOS, 2015). Estes exemplos de trabalhos demonstram que embora tenha sido reduzido o uso desse tipo de marcador, ainda servem como uma boa fonte de informação.

Outro exemplo, com a utilização de marcadores de DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD): em populações de *Eugenia uniflora* para identificar a variabilidade genética (AGUIAR et al., 2013); em populações naturais de *Mandevilla velutina* 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 *I. paraguariensis* (WENDT et al., 2007).

Estudos envolvendo marcadores microssatélites (SSR): com *Araucaria angustifolia* (COSTA et al., 2015; STEFENON; GAILING; FINKELDEY, 2007); com *Manilkara multifida* para elaboração de inferências sobre a conservação genética da espécie endêmica da Mata Atlântica (MORAES et al., 2013); entre tantos outros que estão sendo realizados, demonstrando a importância desta área de estudo.

2.2.2 Fluxo gênico

Fluxo gênico foi definido por Slatkin (1985) como alterações nas frequências dos alelos devido a movimentação de gametas entre populações de uma mesma espécie. Basicamente é a troca de informações genéticas entre indivíduos e populações e a sua transmissão de geração em geração, também considerado como a migração de indivíduos entre populações por geração (HELLBERG et al., 2002).

Tem capacidade de alterar a composição genética original das populações, podendo aumentar a variabilidade (GRIFFITHS et al., 2017), e conectar populações reprodutivamente isoladas realizando a homogeneização genética entre as populações (SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016) minimizando os efeitos da deriva genética, e endogamia. Por afetar a dinâmica das populações, comunidades e ecossistemas, o fluxo gênico tem papel fundamental na biologia evolutiva (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

Pela limitação de mobilidade das espécies florestais, o fluxo gênico pode ocorrer por meio da polinização e dispersão de sementes. No entanto, o processo não depende apenas dos agentes polinizadores e dispersores, depende do sucesso da fertilização e estabelecimento dos migrantes, além do tamanho da população que o recebe (ENNOS, 1994; SLATKIN, 1987), o que o torna um parâmetro difícil de ser mensurado.

A quantificação dos níveis de fluxo gênico em populações naturais pode ser realizada por métodos diretos e indiretos. Em que, os métodos diretos referem-se ao fluxo gênico contemporâneo (atual), e são estimados através de análises de paternidade, por medidas de dispersão de pólen, sementes, e sucesso reprodutivo. Já os métodos indiretos referem-se ao fluxo gênico histórico (passado), e são estimados através de análises de estrutura genética populacional (ENNOS, 1994; SLATKIN, 1987).

Diversos fatores podem afetar este processo, como os mecanismos básicos da interação planta/polinizador e planta/dispersor pela anatomia floral e desenvolvimento dos frutos, e o comportamento dos agentes dispersores (GHAZOUL, 2005). As alterações dos ecossistemas, de origem natural ou antrópicas, podem afetar diretamente o fluxo gênico (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

Como mencionado anteriormente, a mais preocupante, é a fragmentação florestal, que pode causar o isolamento das populações, e conseqüentemente pode restringir o fluxo de pólen e sementes aumentando a estruturação e afetando a diversidade das gerações futuras (SEBBENN et al., 2011). Cabe ressaltar que cada espécie tem padrões de fluxo gênico e diversidade genética diferente. O menor nível de fluxo gênico é importante para a manutenção

das populações como unidade evolutiva única, pois apenas um migrante por geração já é suficiente para anular parcialmente os efeitos da deriva (HARTL; CLARK, 2010).

Os programas de conservação da biodiversidade devem levar em consideração todas as vulnerabilidades das espécies e os seus requisitos, realizando estudos específicos, para garantir a sustentabilidade das populações e a manutenção de fluxo gênico entre elas (GANEM, 2010), evitando o processo de especiação (SLATKIN, 1985).

Uma ferramenta muito útil para a determinação de fluxo gênico são os marcadores moleculares, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para esta finalidade (COLLEVATTI et al., 2010; GODOY et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2019; SATO et al., 2006; SEBBENN et al., 2011).

2.3 MARCADORES MOLECULARES: MICROSSATÉLITES

Com o avanço no desenvolvimento de novas tecnologias com base no ácido desoxirribonucleico (DNA), é possível observar diretamente as diferenças nas sequências de DNA de uma população e entre indivíduos (GRIFFITHS et al., 2017). O que reflete no aumento de informações e da compreensão sobre a variação genética nas populações.

O DNA, material genético primário (PIRES et al., 2011), é consideravelmente simples, em que seus componentes estão dispostos em grupos denominados nucleotídeos, cada um composto por um grupo fosfato, uma molécula de açúcar (desoxirribose), e qualquer uma das quatro bases nitrogenadas (Adenina, Guanina, Citosina e Timina) (GRIFFITHS et al., 2017).

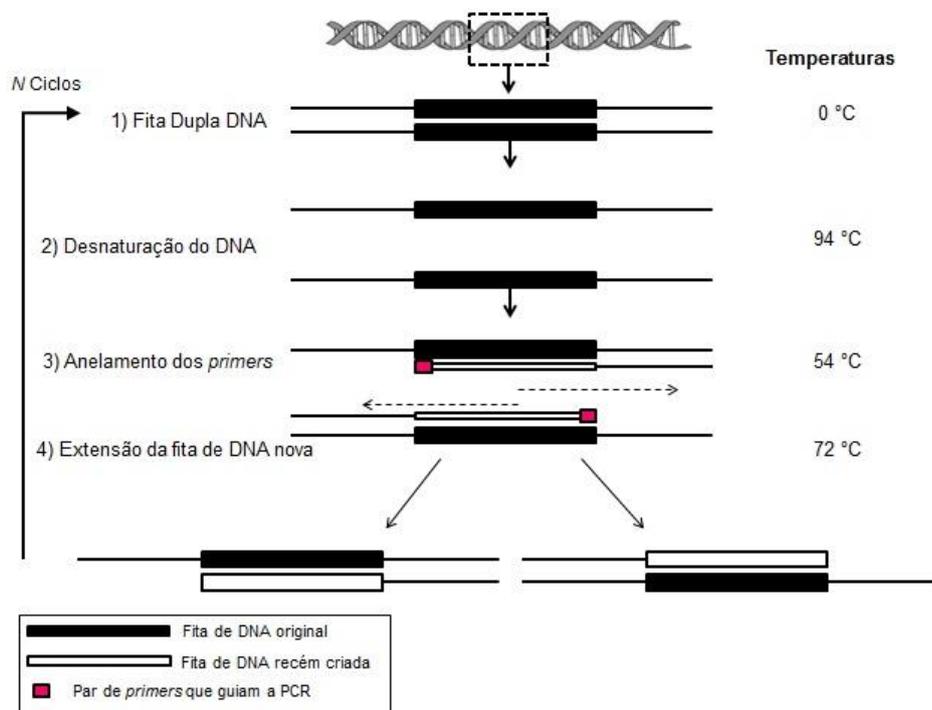
Os marcadores moleculares são ferramentas que auxiliam na obtenção de informações e nos estudos genéticos. São divididos em grupos, de acordo com seu método de análise: (a) os que são baseados em hibridização; (b) baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); e (c) em sequenciamento (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013).

A genética de populações atualmente faz uso extensivo dos marcadores microssatélites, principalmente por dois motivos, primeiro que apresenta um grande número de alelos, e segundo que apresentam uma alta taxa de mutação, significando que os níveis de variação são mais elevados, com chances maiores de quaisquer dois indivíduos apresentar genótipos diferentes (GRIFFITHS et al., 2017).

Estes marcadores utilizam o método de análise da PCR, que é a técnica da biologia molecular que amplifica *in vitro* fragmentos de DNA pela ação de uma enzima de replicação adicionada. O ciclo da PCR envolve três etapas: desnaturação da fita dupla, anelamento dos iniciadores e extensão da cópia. O procedimento consiste basicamente em: (1) com alta

temperatura (geralmente de 92 a 95 °C) ocorre a desnaturação do DNA de fita dupla para fita simples, a qual irá servir de molde para a amplificação; (2) a ligação do iniciador (pequeno fragmento de DNA de fita simples) ao molde, pela complementariedade de bases; (3) através da enzima DNA polimerase há a síntese da segunda fita do DNA-molde; (4) a desnaturação do fragmento de DNA dupla fita formado e início do novo ciclo. São repetidos ciclos até que se formem inúmeras moléculas de DNA (Figura 2) (FERREIRA; GRATTAPLAGIA, 1998; CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013).

Figura 2 – Esquema ilustrativo da amplificação de fragmentos de DNA por meio de PCR



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Os marcadores microssatélites, tem como base a números variados de repetições de sequências simples em tandem (GRIFFITHS et al., 2017), ou seja, uma após a outra, que variam de 1 a 6 pares de bases (pb), amplificadas individualmente por PCR, com a utilização de *primers* específicos (geralmente de 20 a 25 pb), desenhados a partir das sequências do DNA que os flanqueiam. Estas sequências são conservadas entre indivíduos da mesma espécie (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013; FALEIRO, 2007; FERREIRA; GRATTAPLAGIA, 1998).

A detecção dos polimorfismos é através de metodologias que separem os fragmentos amplificados, geralmente são utilizadas técnicas de eletroforese em gel e capilar por sistemas

automatizados, em que as análises são realizadas individualmente e os fragmentos representam os alelos do mesmo loco (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013).

Os microssatélites são classificados de diferentes maneiras, dependendo do tipo de unidade de repetição, sendo do tipo Perfeita (CA)_n, Simples imperfeita (AAC)_nACT(AAC)_n, simples composta (CA)_n(CA)_n e imperfeita composta (CCA)_nTT(CGGA)_n; quanto a localização no genoma, sendo Nuclear (nuSSRs), Cloroplasto (cpSSRs) e Mitocôndria (mtSSRs); e também pelo seu tamanho, sendo Mononucleotídeos (A)_n, Dinucleotídeos (CA)_n, Trinucleotídeos (CGT)_n, Tetranucleotídeos (CAGA)_n, Pentanucleotídeos (AAATT)_n, Hexanucleotídeos (CTTTAA)_n, sendo que “n” é o número de repetições (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013; SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016).

Em espécies florestais, principalmente espécies nativas brasileiras ou até mesmo em exóticas de interesse econômico, iniciou-se os estudos com a utilização de marcadores dominantes, principalmente porque seu genoma não estava sequenciado e, não havia iniciadores específicos desenvolvidos. Entretanto, com o avanço das tecnologias e as pesquisas nesta área, tem-se desenvolvidos muitos marcadores codominantes do tipo microssatélite para diversas espécies nativas.

Como exemplo, pode-se citar alguns trabalhos, em *Podocarpus lambertii* (VIEIRA et al., 2014), em *Araucaria angustifolia* para identificação da dispersão de pólen e semente dentro de uma população (SANT’ANNA et al., 2013). Em populações fragmentadas de *Solanum lycocarpum* e *Solanum crinitum* para quantificar a diversidade e estrutura genética (MOURA et al. 2009). Análise comparativa entre marcadores microssatélites e enzimáticos na estrutura genética e sistemas de cruzamentos em *Euterpe edulis* (CONTE et al., 2008). Investigação da diversidade genética e da estrutura populacional de *Ocotea catharinensis*; *Ocotea odorifera*; *Ocotea porosa* (MARTINS et al., 2014). Estudo em *Butia eriospatha* para investigar a diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de cruzamentos e dinâmica populacional (NAZARENO; ZUCCHI; REIS, 2011), desenvolvimento e validação dos primeiros marcadores microssatélites para *Mimosa scabrella* (SAIKI et al., 2017).

Trabalhos realizados com *I. paraguariensis*, espécie foco deste estudo, como a identificação de microssatélites para a espécie (PEREIRA et al., 2013), informações sobre a variabilidade genética de *I. paraguariensis* no Uruguai (CASCALES et al., 2014).

2.4 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE: *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

2.4.1 Aspectos taxonômicos e botânicos

Com distribuição cosmopolita a família Aquifoliaceae inclui um único gênero (*Ilex*), com aproximadamente 400 espécies (SOUZA; LORENZI, 2019), sendo que destas, 58 espécies ocorrem no Brasil (GROPPO, 2015), em áreas com maior altitude, principalmente nos estados do Sul e Sudeste (SOUZA; LORENZI, 2019). Algumas espécies, devido ao elevado grau de endemismo e perda de habitat estão listadas sob perigo de extinção (QUINET et al., 2013). Representada principalmente por espécies arbórescentes com folhas alternas, simples e geralmente de margem serrada, flores pouco vistosas e fruto do tipo drupa (SOUZA; LORENZI, 2019).

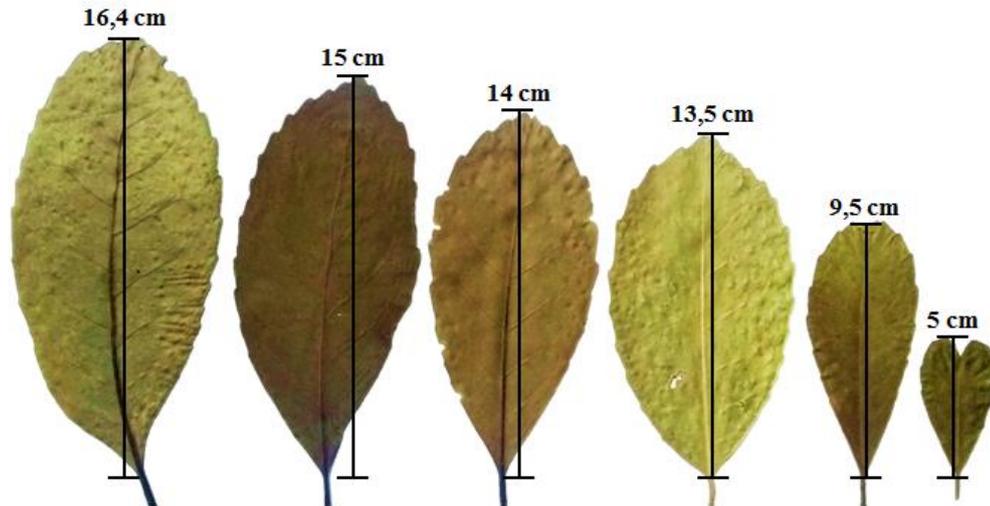
Algumas espécies do gênero *Ilex* são cultivadas pelas suas características ornamentais, como por exemplo, a *I. aquifolium* (azevinho) e *I. cornuta* (ilex-chinês) (SOUZA; LORENZI, 2019). E a mais conhecida é a espécie *I. paraguariensis* que foi classificada pelo viajante e pesquisador francês Auguste de Saint-Hilaire (1779-1853) no início do século XIX (GERHARDT, 2013), o material da espécie está registrado no Herbário do Museu de Paris (BRUXEL et al., 2018). Conhecida popularmente por erva-mate, mate, erveira (GROPPO, 2015; LORENZI, 2016).

Espécie de porte arbóreo, com tronco cilíndrico, reto ou tortuoso, com 30-40 cm de diâmetro (LORENZI, 2016), perene, com grande longevidade, sua altura pode variar dependendo da idade e local de desenvolvimento, podendo atingir até 30 m em áreas naturais de floresta, porém, geralmente não ultrapassa os 7 m de altura quando podada (CARVALHO, 2003; DANIEL, 2009). Com tronco cilíndrico, reto ou pouco tortuoso (CARVALHO, 2003), com lenticelas (CABRAL et al., 2018), casca externa áspera e rugosa, de coloração cinza-claro a acastanhada, e casca interna com textura arenosa (o que pode auxiliar na identificação da espécie) e cor branco-amarelada, com rápida oxidação após incisão, ficando escurecida (DANIEL, 2009).

As folhas são simples, alternas, coriáceas, com formato obovado a elíptico (CABRAL et al., 2018; LORENZI, 2016), com margens serradas irregularmente, geralmente lisa no terço da base, com ápice obtuso (GILBERTI, 1994), apresenta nervuras salientes na face abaxial (CARVALHO, 2003; DANIEL, 2009), além de apresentar característica discolor. O tamanho das folhas pode variar conforme o local de ocorrência da planta (Figura 3), podendo apresentar folhas maiores no interior da mata e menores a pleno sol, devido a menor

intensidade de luz (DA COSTA et al., 2005). A espécie poder apresentar diferentes morfotipos, ou seja, pequenas alterações em órgãos específicos de plantas da mesma espécie, o que consequentemente pode refletir em diferenças na quantidade de compostos químicos, como cafeína, teobromina, taninos (WENDLING; SANTIN, 2014).

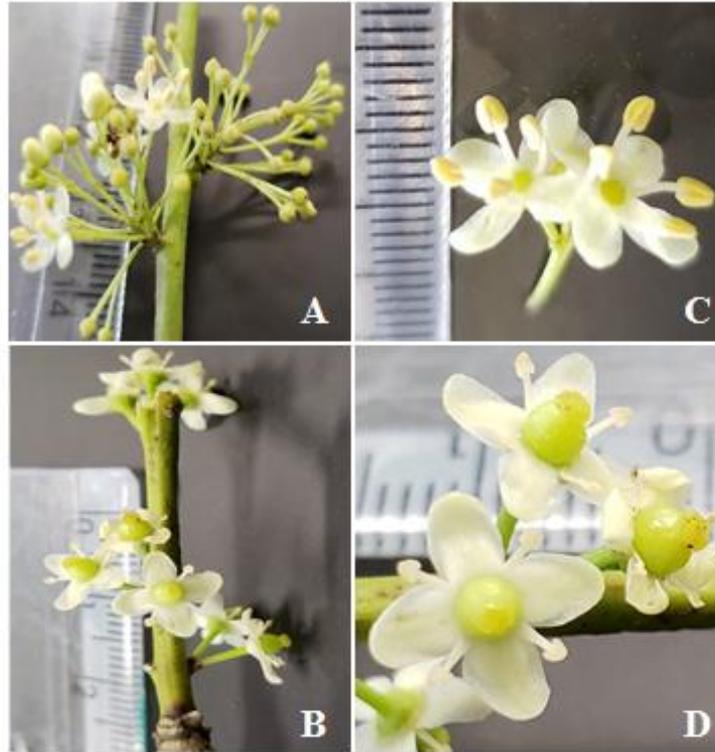
Figura 3 – Folhas de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. com diferentes morfotipos



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Dispostas em inflorescência fasciculada nas axilas foliares as flores de *I. paraguariensis* são pequenas, pouco vistosas e de coloração branca (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2016). Sendo uma espécie dióica, as inflorescências são diferenciadas. As com flores femininas, que possuem o gineceu composto de ovário súpero e bem desenvolvido, estilete curto e estigma amplo, e as anteras são modificadas, com tamanhos menores e estéreis, ou seja, não produzem pólen. As flores masculinas possuem anteras maiores no androceu, perfeitas e férteis, e o gineceu com ovário estéril, abortado, sem estilete e estigma (Figura 4) (PIRES et al., 2014).

Figura 4 – Inflorescências e flores de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (A) inflorescências masculinas; (B) inflorescências femininas; (C) flor masculina, com destaque para as anteras desenvolvidas; (D) flor feminina, destaque para o ovário bem desenvolvido



Fonte: Silva (2019).

Os frutos são do tipo drupa globosa ou oval, glabras e de coloração vermelhas a púrpuras quando maduras (CABRAL et al., 2018; LORENZI, 2016). São relativamente pequenos, praticamente todos os frutos comportam quatro sementes, que apresentam tegumento fino áspero e duro, de cor amarelo claro ou parda (BACKES; IRGANG, 2002; DANIEL, 2009). O endosperma é rico em proteínas e lipídios, entretanto seu embrião é rudimentar (FERREIRA, 1995; KUNIYOSHI, 1983), ou seja, na época da maturação do fruto o embrião não apresenta maturidade fisiológica, estando geralmente em formato cordiforme ou coração (DANIEL, 2009). Para a produção de mudas via seminal, é necessário realizar estratificação na semente, já que esta apresenta dormência múltipla (CARVALHO, 2003; STURION; RESENDE, 2010). Geralmente o processo de estratificação pode durar até seis meses, o método tradicional mais utilizado é de estratificação em areia (DICKEL; RITTER; BARROS, 2011; LORENZI, 2016), estando a sua eficiência relacionada com as tensões de oxigênio, umidade e temperatura (CUNHA; FERREIRA, 1987; DANIEL, 2009), além do tempo para que o embrião complete sua maturação (FERREIRA, 1997).

Considerada uma espécie clímax, esciófita (LORENZI, 2016), ou seja, aceita sombreamento em qualquer etapa de seu desenvolvimento, tolerando mais luz na fase adulta. O período de floração da *I. paraguariensis* ocorre de setembro a dezembro, com maior incidência no mês de outubro (DICKEL; RITTER; BARROS, 2011; LORENZI, 2016; PIRES et al., 2014), dependendo da localidade, e com influência significativa da temperatura, como discutido por Pires et al. (2014), a qual identificou maior floração nos meses mais quentes (médias acima de 13°C). A polinização segundo Ferreira et al. (1983) é basicamente entomófila, sem especificidade de polinizadores, corroborada por estudos recentes (PIRES et al., 2014), embora ainda a hipótese de transferência de pólen pelo vento não seja descartada.

A maturação dos frutos ocorre de Janeiro a Abril (CARVALHO, 2003), podendo se prolongar até Maio dependendo da localidade (PIRES et al., 2014), com heterogeneidade na maturidade fisiológica dos frutos em uma mesma árvore, que pode ser causada pela assincronia na fenofase reprodutiva (SOUSA; AGUIAR; SPOLADORE, 2015). A dispersão das sementes é zoocórica, comumente realizada por pequenos pássaros, como sabiás e pombas (DICKEL; RITTER; BARROS, 2011). A dispersão pode auxiliar na quebra de dormência das sementes de forma natural, devido à passagem da semente pelo sistema digestivo dos dispersores (CUQUEL; CARVALHO; CHAMMA, 1994).

2.4.2 Distribuição natural

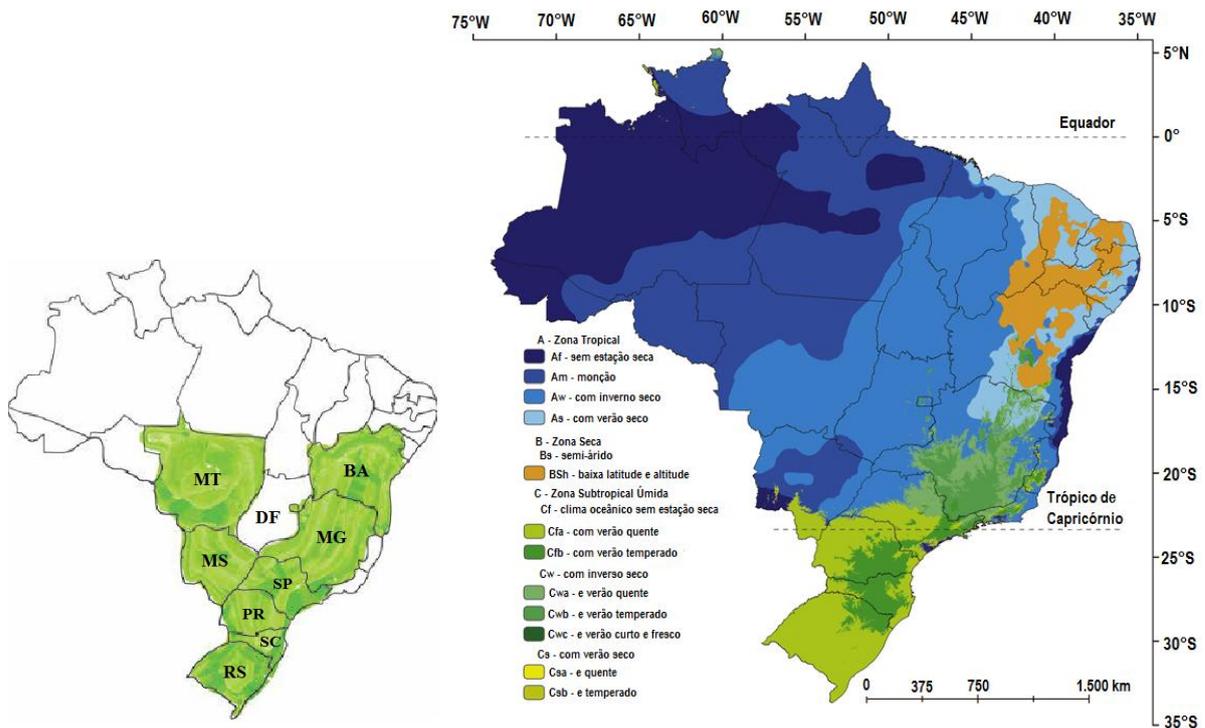
A *I. paraguariensis* segundo critérios da Botânica é uma planta endêmica do continente americano, com ocorrência natural na Argentina, Paraguai e Brasil (OLIVEIRA; ROTTA, 1985), também citada à ocorrência no Equador, Colômbia, Bolívia, Peru e Uruguai (DICKEL; RITTER; BARROS, 2011). Na Argentina e no Paraguai, a ocorrência é principalmente nos sub-bosques das matas do Rio Paraná e afluentes, onde a presença de *Araucaria angustifolia* não é encontrada (GERHARDT, 2013). No Brasil ocorre em regiões de FOM Montana e Altomontana, e Floresta Estacional Semidecidual, geralmente em associação com a *Araucaria angustifolia* (MARTINS-RAMOS et al., 2011; OLIVERIA; ROTTA, 1985), pode ocorrer em matas ciliares e campos rupestres (CABRAL et al., 2018; FLORA DO BRASIL, 2020).

As áreas de ocorrência confirmadas no Brasil são: Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, com distribuição majoritariamente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, e com alguns relatos de ocorrência nos estados de São Paulo,

Minas Gerais, Mato Grosso, Distrito Federal e Bahia (Figura 5) (FLORA DO BRASIL, 2020; LORENZI, 2016).

Os estados do sul do Brasil segundo a classificação de Köppen tem clima predominantemente Cfa (subtropical úmido, com temperatura média do mês mais quente superior a 22°C), seguido pelo Cfb (subtropical úmido, com temperatura média do mês mais quente inferior a 22°C) (ALVARES et al., 2014), logo, dada a ocorrência nos estados, citada anteriormente, a distribuição predominante quanto aos tipos climáticos da espécie são Cfb seguido por Cfa. Pode ocorrer também em pequenas áreas onde os tipos climáticos são Cwa (subtropical úmido, com inverno seco e verão quente) e Aw (tropical com inverno seco) (ALVARES et al., 2014; CARVALHO, 2003; OLIVEIRA; ROTTA, 1985) (Figura 5).

Figura 5 – Áreas de ocorrência confirmadas da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. no Brasil (lado esquerdo). Classificação climática do Brasil segundo Köppen (lado direito)



Fonte: Adaptado de Flora do Brasil (2020) e Alvares et al. (2014).

2.4.3 Usos e importância socioeconômica

A *I. paraguariensis* é uma planta com utilização histórica pelos povos indígenas, chamada de “cangoy” (o que alimenta) o qual faziam uso das folhas para o preparo de bebidas (MACCARI JUNIOR; SANTOS, 2000). Desde a colonização da América do Sul, em que se

identificou a abundância da espécie nativa, e a elevada apreciação pelos índios e colonizadores espanhóis, iniciou-se a exploração e a produção da espécie, que se perpetua até os dias atuais (GERHARDT, 2013; WACHOWICZ, 1972).

Com o decorrer do tempo a demanda e consumo se intensificaram, atualmente tem-se uma ampla utilização das folhas e dos ramos, para a confecção de chás e bebidas estimulantes, as mais conhecidas, consideradas típicas, principalmente na região Sul do Brasil, e países vizinhos, chamada de chimarrão (quando tomada quente) ou tererê (quando tomada fria) (SOUZA; LORENZI, 2019). Outra bebida que é muito consumida e apreciada nas regiões mais quentes é chá mate gelado, além de outras bebidas derivadas de mate (MACCARI JUNIOR; SANTOS, 2000).

Produtos alternativos também são relatados, servindo como matéria prima para corantes naturais, conservantes, produtos alimentícios como balas, sorvetes, gomas, entre outros (MEDRADO, 2003). Além da produção de cosméticos, com finalidade de reduzir e controlar celulites e rugas, rejuvenescimento e proteção da pele, etc., com utilização considerável em países do hemisfério Norte (PAULA; CHOCIAI, 2000).

Popularmente é conhecida pelas suas propriedades medicinais (BRACESCO et al., 2011; CANSIAN et al., 2008), principalmente pela atividade antioxidante (SCHINELLA et al., 2000; VALDUGA et al., 2016), presença de cafeína, teobromina, metilxantinas (GNOATTO et al., 2007; PIRES et al., 2016), além de vitaminas e sais minerais, ácido fólico, entre outros tantos compostos presentes na sua composição. Usada internamente, como diurética, estomáquica, etc., e externamente na forma de cataplasmas em feridas (BACKES; IRGANG, 2002; DICKEL; RITTER; BARROS, 2011). Entretanto, assim como outras plantas medicinais, deve ser utilizada com moderação, devido a riscos toxicológicos (SAMPAIO et al., 2012).

Por se tratar de uma árvore que tolera podas, pode ser utilizada como ornamental em projetos de paisagismo (LORENZI, 2016). Pode ser usada, em plantios com outras espécies em áreas degradadas, em sistemas agroflorestais (MARQUES; REIS; DENARDIN, 2019), com fins ambientais de recuperação e podendo ainda ser aliado a fins econômicos.

Em função da grande utilidade da espécie, a *I. paraguariensis* apresenta grande importância na sociedade, de forma econômica, cultural e ambiental no Brasil (BRASIL, 2012), principalmente nos estados sulinos (BACKES; IRGANG, 2002; MARQUES; REIS; DENARDIN, 2019).

A grande importância está na potencialidade do seu cultivo favorecer a conservação dos remanescentes florestais, do solo, e da água (MARQUES; REIS; DENARDIN, 2019;

MATTOS, 2015). Colaborando na manutenção do pequeno produtor no meio rural (BRASIL, 2017; DUTRA; HANSEL; WENDLING, 2008; MARQUES; REIS; DENARDIN, 2019), já que a produção predominante é pela agricultura familiar, como complemento de renda (BRASIL, 2012).

O ciclo produtivo da espécie envolve diversos segmentos, desde a produção da matéria-prima até o consumidor final, o que tem significativa contribuição na geração de empregos (além do rural), desenvolvimento econômico, expansão de mercado e industrialização (RIGO et al., 2014).

Além da contribuição nos aspectos ambientais e econômicos citados acima, por se tratar de uma atividade ligada a tradições históricas, assume importância cultural e social, já que muitos agricultores sentem satisfação em realizá-la (MARQUES; REIS; DENARDIN, 2019; VIBRANS et al., 2012).

Embora haja uma gama de vantagens no cultivo da erva-mate, seja em ervais nativos ou plantados, ainda se tem grandes desafios. Como a concorrência com outras grandes culturas agrícolas, como o milho, trigo, soja; a diminuição da mão de obra (RIGO et al., 2014). A busca de melhores manejos, com amparo legal, o aumento no incentivo de pesquisas e programas de extensão rural, agregando a produção com as funções sociais e ecológicas (MARQUES; REIS; DENARDIN, 2019), entre outros fatores.

2.4.4 Características genéticas

O elevado consumo, tanto no mercado interno quanto externo, e com as leis vigentes de preservação, somente ervais nativos não cobrem a demanda de uso, com isso, muitos plantios comerciais, homogêneos ou em associação foram implantados. Primeiramente, provenientes de sementes colhidas sem critérios de seleção, o que gerou uma grande heterogeneidade de produção, baixa produtividade e alta mortalidade (STURION; RESENDE, 2010), o que deu início a programas de melhoramento desenvolvidos por empresas de pesquisa como EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina), com técnicas de seleção de progênies, clonagens, etc.

As preocupações destes programas são, com a produção de massa foliar, e melhorias da qualidade do produto final. Entretanto, é necessário levar em consideração e cuidar da manutenção e conservação da variação genética ainda existente. Com isso, muitos estudos

começaram a ser realizados para gerar informações a respeito da distribuição da variação e estrutura genética de *I. paraguariensis*.

Como exemplo, podemos citar: Gauer; Cavalli-Molina (2000), e por Wendt et al. (2007), que com auxílio de marcadores moleculares RAPD, forneceram informações quanto a variação genética da erva-mate em áreas de ocorrência natural, demonstrando, que a mesma se enquadra no padrão esperado para espécies com modo de reprodução alógama, ou seja, a distribuição da diversidade genética é menor entre as populações do que dentro das populações. Entretanto, nestes estudos, as coleções utilizadas representaram pouco da área de ocorrência da espécie.

Com o avanço do conhecimento, buscou-se informações mais consistentes, para tanto, mais trabalhos foram realizados, iniciando com o desenvolvimento dos marcadores codominantes microssatélites para a espécie, realizado por Pereira et al. (2013), que possibilitou a realização de outros trabalhos para o enriquecimento de informações. Como, por exemplo, Cascales et al. (2014) em um estudo realizado com indivíduos de *I. paraguariensis* coletados nas regiões do Uruguai, Argentina, Paraguai e Brasil, encontraram uma média de heterozigosidade esperada (H_e) de 0,504, e observaram correlação significativa entre a distância genética e geográfica para as populações nas áreas de estudo. Trabalhos realizados com marcadores enzimáticos, como o realizado por Reis et al. (2018), na região do Planalto Norte Catarinense, que obtiveram valores de $H_e=0,250$; $H_o=0,239$ e $f=0,042$.

Realizando uma análise mais ampla, com mais populações Silva (2019), analisou 10 populações de indivíduos adultos de erva-mate, distribuídas nos estados de SC e RS, obtendo valores de $H_e=0,770$; $H_o=0,442$ e $f=0,424$. O autor também observou que não há correlação significativa da distância genética e a distância geográfica nas áreas estudadas. A integração de dados demográficos com genéticos nos estudos, também é importante, como realizado por Stedille (2020), que obsevou a presença de estrutura genética espacial e distribuição agregada para a espécie, em populações espontâneas na fitofisionomia Floresta Ombrófila Mista Alto-montana em SC. Observou valores de $H_e=0,502$; $H_o=0,735$ e $f=0,311$. Contribuindo para o avanço no conhecimento das características genéticas da espécie.

3 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

As áreas de estudo foram escolhidas a partir dos resultados obtidos do trabalho de mestrado realizado por SILVA (2019) no grupo de pesquisa Uso e Conservação de Recursos Florestais da Universidade do Estado de Santa Catarina, em que foram avaliadas dez populações de *I. paraguariensis*. As atividades de coleta a campo nestas dez áreas e a análise dos dados obtidos possibilitaram a realização de uma análise prévia, para a escolha das áreas utilizadas no presente estudo (Tabela 1).

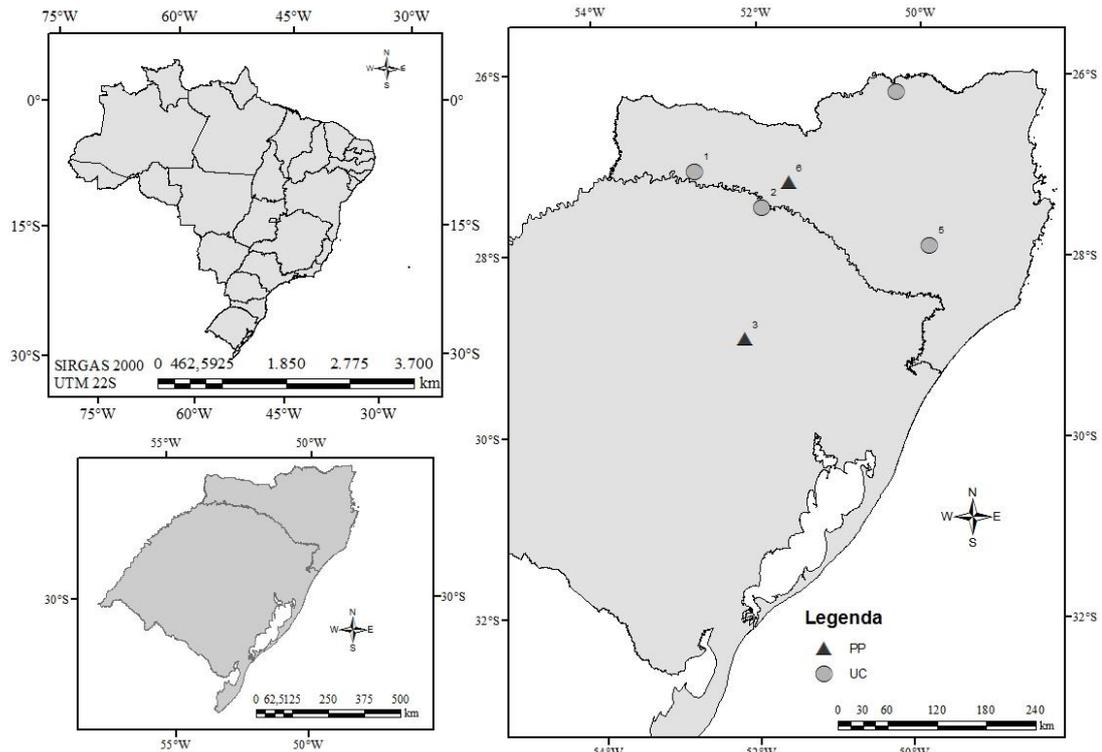
Tabela 1 – Localização e descrição dos remanescentes florestais onde foram realizadas as coletas de material botânico de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

Estado	Cidade	Propriedade	Descrição
SC	Chapecó	Federal	Floresta Nacional de Chapecó
	Três Barras	Federal	Floresta Nacional de Três Barras
	Urupema	Estadual/Particular	RPPNE Complexo Serra da Farofa propriedade de Klabin S/A
	Lacerdópolis	Particular	Propriedades particulares no interior do município
RS	Marcelino Ramos	Municipal	Parque Natural Municipal Teixeira Soares
	Ilópolis	Particular	Propriedade de responsabilidade da Ervateira Valério

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

O principal fator levado em consideração foi à presença de indivíduos regenerantes, o que permitiu a avaliação da coorte regenerante sob o ponto de vista genético, a distribuição geográfica e distância entre elas (Figura 6 e Tabela 2) e o fato destes locais apresentarem distintos históricos de uso e conservação dos remanescentes. Estas particularidades permitiram uma análise mais abrangente do atual estado de conservação da *I. paraguariensis*.

Figura 6 – Disposição geográfica dos remanescentes florestais onde foram realizadas as coletas de material botânico de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. nas Unidades de Conservação (UC) e Propriedades Particulares (PP). Em que: (1) Floresta Nacional de Chapecó; (2) Parque Natural Municipal Teixeira Soares; (3) Propriedade Particular no município de Ilópolis – RS; (4) Floresta Nacional de Três Barras; (5) Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual Complexo Serra da Farofa; (6) Propriedade Particular no município de Lacerdópolis – SC



Fonte: Elaborada pela autora, com auxílio de Douglas Trautmann e Silva (2019).

Tabela 2 – Distância geográfica* em km entre os remanescentes florestais onde foram realizadas as coletas de material botânico de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

Local	Pop 1	Pop 2	Pop 3	Pop 4	Pop 5	Pop 6
PNM Mata do Rio Uruguai Teixeira Soares¹	-					
FLONA de Chapecó²	91,79 km	-				
Propriedade particular em Ilópolis – RS³	162,23 km	213,98 km	-			
RPPNE Complexo Serra da Farofa⁴	209,06 km	299,16 km	251,99 km	-		
FLONA de Três Barras⁵	216,2 km	262,86 km	354,91 km	193,35 km	-	
Propriedade Particular em Lacerdópolis – SC⁶	45,46 km	115,75 km	199,61 km	187 km	170,49 km	-

* distância em linha reta, calculada no Google Earth, não levando em consideração as alterações de elevação.

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

3.1 UNIDADES DE CONSERVAÇÃO

Em 18 de julho de 2000 foi criada a Lei nº 9.985 que institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza – SNUC, em que estabelece critérios e normas para a criação, implantação e gestão das unidades de conservação.

Unidade de Conservação: espaço territorial e seus recursos ambientais, incluindo as águas jurisdicionais, com características naturais relevantes, legalmente instituído pelo Poder Público, com objetivos de conservação e limites definidos, sob regime especial de administração, ao qual se aplicam garantias adequadas de proteção (LEI Nº 9.985, Art. 2º, Inciso I).

Segundo a Lei do SNUC divide-se as unidades de conservação em dois grupos, as de Proteção Integral, com objetivo de preservar a natureza e admitindo apenas o uso indireto dos seus recursos naturais, e as de Uso Sustentável, com objetivo de compatibilizar a conservação com o uso sustentável dos seus recursos naturais.

Parque Nacional é uma das categorias que compõem o grupo das Unidades de Proteção Integral, tendo basicamente o objetivo de preservar os ecossistemas naturais de grande relevância ecológica e beleza cênica. Sendo posse de domínio público, tendo as devidas autorizações pelo órgão responsável, é permitida a realização de atividades de pesquisas científicas, atividades de educação ambiental, turismo ecológico, entre outras. Quando esta categoria é criada pelo município é denominada de Parque Natural Municipal (LEI Nº 9.985, Art. 11).

Dentre as sete categorias que compõem o grupo das Unidades de Uso Sustentável, têm-se: a Floresta Nacional e a Reserva Particular do Patrimônio Natural. A Floresta Nacional (FLONA) é uma área com cobertura florestal predominantemente de espécies nativas. Tem como objetivo básico a utilização sustentável dos recursos florestais e pesquisas científicas (LEI Nº 9.985, Art. 17). Segundo o Decreto nº 1.298 de 27 de Outubro de 1994, que regulamenta as Florestas Nacionais, têm como objetivos, o manejo dos recursos naturais, enfatizando a produção de madeira e outros produtos vegetais; proteção dos recursos hídricos e da beleza cênica, bem como dos sítios históricos e arqueológicos, e, fomentar o desenvolvimento da pesquisa científica básica e aplicada, educação ambiental, lazer e turismo.

Caracterizada por uma área privada, gravada com perpetuidade a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) tem como objetivo a conservação da diversidade biológica, e somente é permitida, conforme regulamento, a pesquisa científica e a visitação com objetivos

turísticos, recreativos e educacionais (LEI N° 9.985, Art. 21). Sendo a primeira categoria de UC regulamentada após a publicação da Lei do SNUC pelo Decreto n° 5.746 de 5 de abril de 2006.

3.1.1 Parque Natural Municipal Mata do Rio Uruguai Teixeira Soares

O Parque está situado no município de Marcelino Ramos, no Estado do Rio Grande do Sul, próximo à foz do rio Teixeira Soares, afluente do Rio Uruguai, foi criado através da Lei Municipal n° 028/2008 de 05 de junho de 2008, com área de 423,361 hectares (ha) aproximadamente. Segundo o Plano de Manejo do Parque de 2012, o Parque está localizado no Bioma Mata Atlântica em uma região de transição entre algumas das fitofisionomias mais ameaçadas, a Floresta Estacional Decidual e a Floresta Ombrófila Mista. Portanto, mesmo que a área do parque seja relativamente pequena, é de tamanha importância a sua conservação.

O nome da Unidade de Conservação presta homenagem ao engenheiro carioca João Teixeira Soares, que propôs a implantação de uma ferrovia entre Santa Maria – RS e São Paulo – SP e a formação florestal típica que cobria originalmente toda a região.

Devido aos diversos usos intensivos da terra historicamente como cultivo (permanentes ou temporárias), pastagens e edificações, a cobertura vegetal atual do parque é caracterizada por um mosaico de diversos tipos de cobertura vegetal e uso da terra. Com cobertura de Floresta Secundária em estágio Inicial, Médio e Avançado, além de pequenos remanescentes de Floresta Primária, a presença de espécies exóticas invasoras, e manchas com reflorestamentos de Pinus e Eucaliptos.

No processo de coleta de material botânico de *I. paraguariensis* para o presente estudo, observou-se pouca quantidade de indivíduos adultos, entretanto, estes indivíduos com elevada frutificação. Também foi observada a presença de pequenos plantios antigos nas áreas do parque, provavelmente de alguma propriedade familiar, e neste caso, foi tomado o cuidado de realizar as coletas o mais distante possível dessas áreas.

Foi identificada elevada ocorrência de indivíduos regenerantes, principalmente em áreas com maior abertura do dossel, com espécies arbóreas de pequeno porte no entorno (Figura 7).

Figura 7 – Indivíduos regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. no Parque Natural Municipal Mata do Rio Uruguai Teixeira Soares, em áreas com maior abertura do dossel, com abundância de regenerantes e ocorrência em aglomerados



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

3.1.2 Floresta Nacional de Chapecó

Área localizada no oeste de Santa Catarina, nos municípios de Guatambu e Chapecó. Inicialmente na sua implantação em 1962 tinha o nome de Parque Florestal João Goulart, destinada ao plantio de *A. angustifolia* para o seu estudo e para a implantação de espécies exóticas como *Pinus elliottii* e *P. taeda*. Após a extinção do Instituto Nacional do Pinho, foi denominada pela Portaria do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF) n° 560/68 em 25 de outubro de 1968 como Floresta Nacional de Chapecó.

Segundo Plano de Manejo de 2013 (Vol. I) a unidade engloba 1.590,60 ha, dividida em três glebas, sendo a Gleba I e III situado no município de Guatambu e a Gleba II no município de Chapecó. A região da FLONA Chapecó abrange ainda o município de Cordilheira Alta, pois uma parte da bacia do rio Sanga Capinzal que drena para a FLONA Chapecó foi incluído em sua Zona de Amortecimento.

A fitofisionomia predominante da região onde se insere a FLONA Chapecó é a Floresta Ombrófila Mista conforme classificação fitogeográfica proposta por Klein (1978), abrigando espécies ameaçadas como *A. angustifolia*, *Ocotea odorifera* e *Dicksonia*

sellowiana. Se tratando dos recursos florestais não madeireiros, além do pinhão, têm abundância de erva-mate.

Durante as coletas de material botânico para o presente estudo, que foram realizadas principalmente na gleba I, por ser a de maior tamanho e cobertura florestal nativa, foi observada uma grande heterogeneidade quanto à fisionomia da floresta, com partes que se encontram em estágio avançado de regeneração e não apresentando indícios de interferência exploratória há muitos anos, e outras com estado muito alterado, com pontos em que o sub-bosque apresenta aspecto degradado, com presença de arbustos, gramíneas e alta regeneração de taquaras, devido a uma provável exploração no passado. Observações estas que condizem com os dados de levantamentos realizados no plano de manejo da FLONA Chapecó.

Em relação a *I. paraguariensis*, foram observados muitos indivíduos adultos, com grandes diâmetros, poucos indivíduos em frutificação, e relativamente pouca regeneração natural da espécie, quando comparada a área anterior. A maioria dos indivíduos regenerantes encontrados foi em áreas com maior incidência luminosa e sub-bosque com menor desenvolvimento (Figura 8).

Figura 8 – Indivíduos regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na Floresta Nacional de Chapecó, em áreas com maior incidência de luminosidade e com sub-bosque pouco desenvolvido, observação para a ocorrência de gramíneas e taquaras em final de ciclo



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

3.1.3 Floresta Nacional de Três Barras

Localizada no planalto norte de Santa Catarina, no município de Três Barras, com área total de 4.458,50 ha, assim como a FLONA de Chapecó após a extinção do Instituto Nacional do Pinho, de Parque Florestal Joaquim Fiúza Ramos passou a ser denominada Floresta Nacional de Três Barras pela Portaria do IBDF nº 560 em 25 de outubro de 1968.

Segundo o Plano de Manejo de 2016 (Vol. I), a FLONA de Três Barras historicamente conhecida pela elevada comercialização de madeira provinda dos plantios florestais, após a aprovação da Lei do SNUC passou a concentrar as atividades a conservação da natureza. Apesar de se tratar de remanescentes com intensa exploração passada, encontra-se em estágio bastante avançado de regeneração, exercendo uma importante função ecológica para a região, principalmente pelas áreas de reflorestamento de *A. angustifolia* que já apresentam uma função ecológica próxima a da floresta nativa.

A vegetação da FLONA de Três Barras é composta por Floresta Ombrófila Mista, destacada pela presença marcante da *A. angustifolia* dominando o dossel, caraguatá (*Bromelia anthiacanta*) e xaxim (*D. sellowiana*) no sub-bosque (KLEIN, 1978).

No caminhamento durante as coletas de material botânico realizadas na região foi observado, assim como na FLONA de Chapecó uma grande heterogeneidade na fisionomia da floresta, principalmente pelo histórico de utilização dessas áreas. Foi identificada uma grande quantidade de indivíduos adultos de *I. paraguariensis*, entretanto, muitos desses de difícil acesso para coleta, devido a grande quantidade de caraguatás no sub-bosque, fato que também dificultou a coleta de material foliar de indivíduos regenerantes. A maioria dos indivíduos regenerantes encontrados foi em regiões com sub-bosques menos desenvolvidos e maior incidência de luz (Figura 9).

Figura 9 – Indivíduos regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na Floresta Nacional de Três Barras, em áreas com maior incidência de luminosidade e sub-bosque menos desenvolvido



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

3.1.4 Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual Complexo Serra da Farofa

Localizada na Serra Catarinense engloba os municípios de Rio Rufino, Urubici, Bocaina do Sul, Painel e Urupema, a RPPNE Complexo Serra da Farofa reconhecida pela Portaria n° 026/2014 – FATMA de 26 de março de 2014 é pertencente à empresa Klabin S.A. e possui área total de 4.987,16 ha, dividida em seis blocos compostos por floresta nativa.

As coletas do presente estudo foram realizadas no Bloco I, conhecido com Fazenda das Nascentes, por conter quatro das cinco nascentes do rio Caveiras, responsável pelo abastecimento da cidade de Lages e afluentes do rio Canoas, com área de 1.518,57 ha.

A área compreende um mosaico, de trechos com áreas úmidas mais frequentes nas áreas mais baixas da fazenda, e áreas de campos naturais com indício de antropização, configurando diferentes estágios de sucessão. A extração seletiva de espécies arbóreas e a utilização da área para pecuária no seu histórico, conseqüentemente ocasionou danos à vegetação do sub-bosque e comprometeu a dinâmica da comunidade vegetal (MARTINS-RAMOS et al., 2011).

A RPPNE Complexo Serra da Farofa é considerada uma floresta de alto valor de conservação, pois se tem a proteção de nascentes e mananciais, conservação da flora e da fauna, com a presença de espécies de plantas e animais ameaçados de extinção (COUTO; MOURA, 2018).

Nas coletas do material botânico para o estudo, foi observada a presença considerável de taquaras, provavelmente devido ao histórico de uso da área, também identificado a abundante ocorrência de *D. sellowiana*.

Em relação a *I. paraguariensis* foi observada uma elevada ocorrência de indivíduos de todas as classes demográficas, facilitando a coleta do material, também foi observado que a maioria dos indivíduos ocorre nas regiões mais baixas e úmidas, e à medida que aumenta a altitude há uma diminuição na quantidade de indivíduos. Foi identificada uma grande quantidade de indivíduos regenerantes, principalmente em regiões com maior incidência de luz e maior umidade, próximos a córregos, e, em áreas de sub-bosque menos desenvolvido, como já relatado para as demais áreas de estudo (Figura 10).

Figura 10 – Indivíduos regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual Complexo Serra da Farofa – Fazenda das Nascentes, em áreas com maior incidência de luminosidade e umidade, com destaque para indivíduos ocorrentes na beira de córregos



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

3.2 PROPRIEDADES PARTICULARES

De acordo com a Lei nº 12.651, de 25 de Maio de 2012 (Código Florestal Nacional), que dispõe sobre a proteção da vegetação nativa. Imóveis rurais particulares devem manter uma porcentagem mínima de Reserva Legal.

Reserva Legal: área localizada no interior de uma propriedade ou posse rural, delimitada nos termos do art. 12, com a função de assegurar o uso econômico de modo sustentável dos recursos naturais do imóvel rural, auxiliar a conservação e a reabilitação dos processos ecológicos e promover a conservação da biodiversidade, bem como o abrigo e a proteção de fauna silvestre e da flora nativa (LEI Nº 12.651, Art. 3, Inciso III).

É autorizada a utilização de produtos florestais não madeireiros nestas áreas, desde que respeitados os regulamentos previstos no Código Florestal e principalmente manter a integridade e conservação da área.

Todas as coletas de material botânico nas propriedades particulares foram realizadas em áreas de floresta com histórico de conservação que compõem Reservas Legais e Áreas de Preservação Permanente (APP).

Área de Preservação Permanente - APP: área protegida, coberta ou não por vegetação nativa, com a função ambiental de preservar os recursos hídricos, a paisagem, a estabilidade geológica e a biodiversidade, facilitar o fluxo gênico de fauna e flora, proteger o solo e assegurar o bem-estar das populações humanas (LEI Nº 12.651, Art. 3, Inciso II).

3.2.1 Propriedade Particular no município de Lacerdópolis – SC

A vegetação desta área se enquadra na transição da Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Decidual. A vegetação presente se caracteriza como secundária, a qual foi submetida no passado a exploração seletiva de madeira. Atualmente faz parte de um remanescente de uma propriedade particular.

Durante as coletas do material botânico, observou-se que as áreas florestadas da propriedade são divididas em pequenos fragmentos separados por áreas com atividades agropecuárias. Nos fragmentos foi identificada a ocorrência de elevado número de indivíduos adultos de *I. paraguariensis*, alguns com elevado diâmetro e altura, outros de pequeno porte mas em estágio reprodutivo, atualmente os indivíduos de erva-mate da área são manejados, sendo que os indivíduos adultos do interior dos fragmentos são utilizados como matrizes de sementes para plantios de ervais homogêneos em áreas na proximidade.

Um grande número de regenerantes foi observado nesta área, provavelmente devido a disponibilidade de matrizes produtoras de sementes e pelo ambiente florestal se encontrar em condições favoráveis.

3.2.2 Propriedade particular no município de Ilópolis – RS

A propriedade localizada no interior do município de Ilópolis – RS é filiada a Ervateira Valério, a qual faz o manejo e coleta das folhas de *I. paraguariensis*, em plantios existentes na propriedade, para beneficiamento e comercialização dos produtos.

O remanescente florestal, configurado como APP e Reserva Legal, pertence à família do proprietário a mais de 50 anos, e foi relatado que antigamente realizava-se a coleta das folhas de erva-mate para fins comerciais, portanto tem estradas e caminhos dentro deste remanescente, e atualmente algumas dessas estradas ainda são utilizadas e eventualmente são realizadas coletas de pinhão e erva-mate.

Durante as coletas, observou-se uma grande quantidade de indivíduos adultos, de grande porte, ocorrendo geralmente em áreas com a presença de araucárias. Foi identificado que a maior ocorrência de indivíduos regenerantes é em áreas com o sub-bosque menos desenvolvido, com dossel mais aberto, com incidência maior de luminosidade e em áreas com maior umidade, próximos a cursos d'água (Figura 11).

Figura 11 – Indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. em propriedade particular em Ilópolis – RS. (A) área de sub-bosque menos desenvolvido, com maior abertura e incidência de luminosidade. (B) indivíduo regenerante ocorrente na beira do curso d'água



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

4 CAPÍTULO I

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE INDIVÍDUOS ADULTOS E REGENERANTES DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

4.1 RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma espécie nativa e de elevado consumo. No Sul do Brasil ocorre principalmente em áreas do Bioma Mata Atlântica, regiões que apresentam um cenário com muitas alterações nos ecossistemas, como a fragmentação florestal. A fragmentação pode ocasionar perda na diversidade genética das espécies. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar a diversidade, estrutura genética e fluxo gênico histórico em remanescentes florestais de *Ilex paraguariensis* nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com marcadores microssatélites desenvolvidos para espécie. Foram coletadas amostras foliares de 600 indivíduos, abrangendo seis áreas de estudo (Floresta Nacional de Chapecó, Floresta Nacional de Três Barras, Parque Municipal Teixeira Soares, Complexo Serra da Farofa, e propriedades particulares nos municípios de: Ilópolis – RS, e Lacerdópolis – SC), sendo todas populações nativas. Foram coletadas amostras foliares de 50 indivíduos adultos e 50 indivíduos regenerantes por população, respeitando a distância mínima de 50 m entre plantas. As frequências alélicas mostraram a existência de alelos raros (freq. $\leq 5\%$) e alelos exclusivos das populações. Não houve diferença significativa para os índices de diversidade entre as populações, nem entre os indivíduos adultos e regenerantes nas áreas e entre áreas, porém com índices de fixação significativos e bastante elevados ($f=0,461$ – adultas; $f=0,424$ – regenerantes), o que sugere desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Pela Análise Molecular da Variância (AMOVA) a diversidade genética foi menor entre as populações (10%) do que dentro das populações (90%), seguindo o padrão identificado por outros trabalhos. De maneira geral os valores dos índices de estrutura genética F de Wright para as populações regenerantes foram menores que as adultas, e quando comparadas, foram verificadas diferenças significativas entre elas. Não há correlação entre a divergência genética e a distância geográfica para as populações de indivíduos adultos e regenerantes. Houve redução na divergência genética das populações adultas para as regenerantes, indicando a presença de fluxo gênico histórico entre as populações e a manutenção da capacidade de conservação da variabilidade genética ao longo das gerações. Os resultados obtidos evidenciam a manutenção da diversidade genética presente em *I. paraguariensis* nas áreas estudadas, mesmo com a presença de fragmentação nas áreas. No entanto, recomenda-se

conservar fragmentos de tamanho maior, e se possível com ligações entre fragmentos, para manutenção da variabilidade genética intrapopulacional.

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

4.2 ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a native species with high consumption. In southern Brazil it occurs mainly in areas of the Atlantic Forest Biome, regions that present a scenario with many changes in ecosystems, such as forest fragmentation. Fragmentation can lead to a loss in the genetic diversity of species. Thus, the objective of this work was to evaluate and characterize the diversity, genetic structure and historical gene flow in forest remnants of *Ilex paraguariensis* in the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, with microsatellite markers developed for the species. Leaf samples were collected from 600 individuals, covering six study areas (Chapécó National Forest, Três Barras National Forest, Teixeira Soares Municipal Park, Serra da Farofa Complex, and private properties in the municipalities of: Ilópolis – RS, and Lacerdópolis – SC), all of which are native populations. Leaf samples were collected from 50 adult individuals and 50 regenerating individuals per population, respecting a minimum distance of 50 m between plants. Allele frequencies showed the existence of rare alleles (freq. \leq 5%) and unique alleles to populations. There was no significant difference for the diversity indexes between populations, nor between adults and regenerating individuals in the areas and between areas, but with significant and quite high fixation indexes ($f=0.461$ - adults; $f=0.424$ - regenerating), suggesting deviation in the Hardy-Weinberg equilibrium. By Molecular Analysis of Variance (AMOVA), genetic diversity was lower among populations (10%) than within populations (90%), following the pattern identified by other studies. In general, the values of Wright's F genetic structure indexes for regenerating populations were lower than for adults, and when compared, significant differences were observed between them. There is no correlation between genetic divergence and geographic distance for adult and regenerating populations. There was a reduction in genetic divergence from adult populations to regenerating ones, indicating the presence of historical gene flow between populations and the maintenance of the genetic variability conservation capacity over generations. The results obtained evidence the maintenance of the

genetic diversity present in *I. paraguariensis* in the studied areas, even with the presence of fragmentation in the areas. However, it is recommended to conserve larger fragments, and if possible with links between fragments, to maintain intrapopulation genetic variability.

Keywords: Microsatellite markers. Yerba mate. Genetic variability. Gene flow. Population genetics.

4.3 INTRODUÇÃO

Considerado o segundo maior ecossistema do mundo em biodiversidade, o Bioma Mata Atlântica tem elevada importância no território nacional (MMA, 2020;). Além dos diversos benefícios para a conservação ambiental, tem grande importância para a economia brasileira, através dos serviços ambientais que têm participação no Produto Interno Bruto brasileiro (PIB) (SEMA, 2019).

A Mata Atlântica é considerado um dos Biomas mais ameaçados, devido as atividades de exploração histórica e o cenário atual de desmatamentos (CAMPANILLI; SCHAFFER, 2010; ELIAS; PADILHA; SANTOS, 2016; NEGRINI et al., 2014). Incluído como um dos 34 *hotspots* de biodiversidade mundial (MITTERMEIER et al., 2004), o que torna essencial a sua conservação, e o planejamento de seu uso e desenvolvimento sustentável.

O estado de Santa Catarina está completamente inserido no Bioma, com 29% de remanescentes de sua cobertura original (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2020; VIBRANS et al., 2012). O Rio Grande do sul abriga o Bioma predominantemente nas regiões do norte e nordeste, com 7,5% de áreas remanescentes da original (SFB, 2018), e estas áreas apresentam elevado grau de fragmentação (CARGNIN et al., 2019). Uma das fisionomias florestais presente nestes remanescentes é a Floresta Ombrófila Mista, caracterizada principalmente pela presença da *Araucaria angustifolia* em associações com outras espécies. Uma formação com paisagens heterogêneas, com estruturas, composições e dinâmicas das florestas diferentes dependendo da localidade (CRUZ et al., 2018; KERSTEN; BORGIO; GALVÃO, 2015; SONEGO; BACKES; SOUZA, 2007). Esta formação florestal é considerada uma das mais ameaçadas (CARLUCCI et al., 2011) dado o seu histórico de exploração, o estado atual de fragmentação e com a composição original alterada (HIGUCHI et al., 2012; GASPER et al., 2013b).

A redução dos remanescentes em pequenos fragmentos pode levar a redução e isolamento das populações presentes, e este isolamento pode interferir no fluxo gênico e

assim favorecer a deriva genética. O que pode causar estruturação, perda da variabilidade genética destas populações e interferir na capacidade adaptativa das espécies (GRIFFITHS et al., 2017; SEBBENN et al., 2011).

Nas espécies florestais, devido à mobilidade, o fluxo gênico depende dos agentes polinizadores e dispersores das sementes. Entre outros fatores, como, por exemplo, o sucesso de fertilização e estabelecimento dos migrantes e o tamanho da população que recebe esses migrantes (ENNOS, 1994; SLATKIN, 1987). Uma das formas de quantificar o fluxo gênico é através de análises de estrutura genética populacional, obtendo-se informações genéticas dos indivíduos adultos e contrastando com os indivíduos regenerantes da mesma localidade, este é um método indireto e trata-se do fluxo gênico histórico (SLATKIN, 1987), já que é difícil afirmar a qual geração o indivíduo regenerante pertence.

O conhecimento da diversidade e estrutura genética das populações, e como a diversidade está distribuída permite criar melhores estratégias para a conservação e uso das espécies e a sua manutenção (PIRES et al., 2011; REIS et al., 2012). Principalmente quando se trata de uma espécie com grande utilização e importância econômica, ambiental, social e cultural como a erva-mate.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*), pertence à família Aquifoliaceae, com ocorrência natural na Argentina, Paraguai e Brasil (OLIVEIRA; ROTTA, 1985). No Brasil tem distribuição majoritária nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul (FLORA DO BRASIL, 2020; LORENZI, 2016), principalmente em áreas com a presença da *Araucaria angustifolia* (MARTINS-RAMOS et al., 2011).

Planta dióica, com indivíduos com flores femininas e indivíduos com flores masculinas (PIRES et al., 2014). Suas sementes apresentam dormência múltipla (CARVALHO, 2003; STURION; RESENDE, 2010), sendo necessária estratificação para obter algum sucesso na germinação. A polinização é basicamente entomófila (FERREIRA et al., 1983; PIRES et al., 2014), e a dispersão zoocórica, realizada principalmente por pequenos pássaros (DICKEL; RITTER; BARROS, 2011).

Espécie de ampla utilização das folhas e dos ramos na confecção de chás e bebidas estimulantes como o chimarrão (SOUZA; LORENZI, 2019), também com uso medicinal (BRACESCO et al., 2011; CANSIAN et al., 2008), ornamental e ambiental (LORENZI, 2016), entre outros.

Com o elevado consumo, teve-se uma exploração histórica dos ervais nativos, e uma crescente demanda por implantação de plantios comerciais, com isso é necessário realizar estudos para obter informações quanto à diversidade da espécie, para criação de estratégias

para conservação e seu uso. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética, estrutura genética e fluxo gênico histórico de indivíduos adultos e regenerantes de *I. paraguariensis* em seis remanescentes florestais de Floresta Ombrófila Mista.

Com as hipóteses de que, como ambientalmente pode existir o equilíbrio na atuação dos fatores evolutivos opostos, e por se tratar de uma espécie de fecundação cruzada, o que aumenta às chances de trocas de alelos, logo, a diversidade genética dos indivíduos regenerantes em relação aos indivíduos adultos dentro de uma população é mantida. Pelo fato de que historicamente os remanescentes florestais formavam um contínuo florestal, o menor nível de fluxo gênico ter importância para a manutenção das populações, e apenas um migrante por geração diminuir os efeitos de estruturação, logo, a distribuição da diversidade genética entre as populações de indivíduos regenerantes é menor do que dentro.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Coleta do material vegetal

Foram coletadas amostras foliares de indivíduos adultos (reprodutivos) e regenerantes de *I. paraguariensis* em seis remanescentes florestais, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As populações e sua denominação utilizada para a apresentação dos resultados e discussão ao longo do trabalho, com as respectivas coordenadas geográficas de referência de cada local, estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Denominação das populações de indivíduos adultos e regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. e coordenadas geográficas

Local	Adultas	Regenerantes	Latitude	Longitude
PNM Mata do Rio Uruguai Teixeira Soares	MR-A	MR-R	27°30'04,11" S	51°57'10,4" O
FLONA de Chapecó	CCO-A	CCO-R	27°06'35,5" S	52°44'58,9" O
Propriedade particular em Ilópolis – RS	PI-A	PI-R	28°57'17,7" S	52°09'51,0" O
RPPNE Complexo Serra da Farofa	SF-A	SF-R	27°54'59,0" S	49°52'04,6" O
FLONA de Três Barras	TB-A	TB-R	26°12'49,2" S	50°18'49,2" O
Propriedade Particular em Lacerdópolis – SC	PL-A	PL-R	27°13'02,1" S	51°35'10,6" O

PNM - Parque Natural Municipal; FLONA - Floresta Nacional; RPPNE - Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Em cada população foram amostrados 50 indivíduos adultos, distantes no mínimo 50 m entre si, e 50 indivíduos regenerantes (considerados >10 cm até 100 cm de altura), distantes no mínimo 30 m entre si. As distâncias de coletas entre indivíduos foram utilizadas para a redução das chances de coletar indivíduos aparentados, seguindo o padrão utilizado nas coletas do Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina (VIBRANS et al., 2012), condizendo com estudos de estrutura genética espacial (EGE) realizado para a espécie (STEDILLE, 2020), que recomenda uma distância mínima de 20 m entre indivíduos para coletas. Para todos os indivíduos amostrados foram coletadas informações de localização geográfica.

As amostras foliares coletadas foram armazenadas em sílica, para secagem e amenização da oxidação, e devidamente identificadas até serem levadas ao Laboratório de Genética do Instituto de Melhoramento e Genética Molecular (IMEGEM) da UDESC, em Lages, SC, onde foram realizadas as demais etapas.

4.4.2 Isolamento e amplificação do DNA genômico

O DNA genômico das folhas de *I. paraguariensis* foi extraído utilizando o protocolo descrito por Doyle; Doyle (1987), modificado por Silva; Bittencourt; Mantovani (2018) para a espécie em estudo (Anexo I).

Para a amplificação via PCR (Reação em cadeia da Polimerase), foram utilizados 13 *primers* microssatélites desenvolvidos por Pereira et al. (2013), separados em três painéis multiplex, otimizados em função da temperatura de anelamento (Tabela 4), pelos membros do grupo de pesquisa Uso e Conservação de Recursos Florestais da Universidade do Estado de Santa Catarina, também utilizados nos trabalhos de Silva (2019) e Stedille (2020).

O protocolo utilizado para amplificação foi baseado no manual da *Taq* DNA Polimerase com adaptações. O Mix para a reação com volume final ajustando de 12,5µl, foi constituído por:

- Água ultra pura;
- Tampão da *Taq* polimerase 1X (Invitrogen);
- 2,0 mM MgCl₂ (Invitrogen);
- 0,02 mM de cada dNTP (Invitrogen);
- 0,02 µM de cada *primer*;
- 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen);
- 2 µl da amostra de DNA na concentração de 10 ng/µl.

A fase de desnaturação inicial foi realizada a 94°C por 1 min, seguida por 30 ciclos de: 94°C para desnaturação por 1 min, temperatura de anelamento correspondente a cada painel multiplex (56, 60 e 61°C) (Tabela 4) por 1 min, e, 72°C por 1 min, por fim 10 min de extensão final a 72°C, sendo mantidos a 4°C∞, até a retirada, em termociclador Veriti® Thermo Scientific®.

Tabela 4 – Sequência dos iniciadores e motivo dos marcadores microssatélites de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. e condições da temperatura de anelamento na PCR

Locus	Sequência (5' – 3')	CF	Motivo	T _a (°C)
Ipg_07	F: CTAGTCGACTCGGCAGTTCC R: TCGACGACGTGTATTTTGTG	PET	(AG) ₁₃	56
Ipg_28	F: AAATTCCATAGCATCATTTGGG R: TGGGTGTTTCATCTAGCCTCTTT	PET	(CA) ₈	56
Ipg_21	F: GGTAACGGGTGGTCATCTATGT R: ACGTACCATCATCGGTGAGTTT	6-FAM	(AT) ₈	56
Ipg_22	F: AAATCCCGAAGAAGGTGGAG R: TAGACGCTTCCACAACGTCA	NED	(AT) ₈	56
Ipg_06	F: GAGAAACGGCAACAGTGGTC R: CACACCTCTCTACACACCCTCA	VIC	(AG) ₁₂	60
Ipg_10	F: TCTTCTCGATCAAAGGAACCTC R: GAGGAAATTCAGAGGCATCAAC	6-FAM	(AG) ₈	60
Ipg_19	F: TGAACATTGGAATCCTAGACCC R: CCGTATATCCCTAAATGCCAAA	NED	(GA) ₇	60
Ipg_41	F: AACGCGTGGATCTAATCTTCAT R: CAAGCTGCAGAGTGATTTGTGT	NED	(TC) ₂₁	60
Ipg_49	F: ATTGCCATAGATCGAAAGGAGA R: TTTTCTCCCCATTTACTTCATCA	6-FAM	(TC) ₈	60
Ipg_01	F: CTTTAACTTTTCGCGGCTTAGA R: GCAAGTGACAAAATACATACGGTC	VIC	(AC) ₁₂ (CT) ₁₃	61
Ipg_03	F: TGCCTATGTCTTCTACAATGCTTC R: CATGGGTTTGGTCTCACTAACA	PET	(ACC) ₁₀	61
Ipg_08	F: GAATTGCCTTATATGGGTGGAA R: GTACACATAAATGGGTTGCCT	NED	(AG) ₆	61
Ipg_46	F: TGATCGTCGTTAACAGCATAAA R: GAGTGTCAACTAAGCTTTACCTAAGAA	VIC	(TC) ₇	61

CF - Cor da Fluorescência; T_a - Temperatura de anelamento.

Fonte: Elaborada pela autora (2020). Adaptada de Pereira et al. (2013).

Para genotipagem dos indivíduos de *I. paraguariensis* foi utilizado Sequenciador Automático ABI 3130 (Applied Biosystems), no qual foi realizada a leitura de fluorescência de cada amostra amplificada, por meio da técnica de eletroforese capilar. 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).

4.4.3 Análise de dados

Primeiramente para a identificação de alelos nulos, ou seja, a não amplificação de alelos que causam erros de genotipagem, foi utilizado o programa Micro-Checker Versão 2.2.3 (OOSTERHOUT et al., 2004). A caracterização da diversidade genética das populações foi realizada com a análise do número de alelos por loco (A), número de alelos efetivos (A_e), índice de informação de Shannon (I), heterozigosidade observada (H_o), e heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e). Também foram estimados os alelos raros (somatório dos alelos com frequência menor que 5% dentro de uma população) e exclusivos. Para a estimativa desses índices foi utilizado o programa GenAlEx (PEAKALL; SMOUSE, 2006; 2012). Os intervalos de confiança (IC) para as médias, a 95% de confiança, foram calculados, a fim de investigar diferenças nos índices de diversidade genética, pela expressão $IC = \bar{y} \pm t(\alpha=0,05) * EP$, em que EP é o erro padrão da média. Os índices de fixação (f) foram calculados pela expressão $f = 1 - (\hat{H}_o / \hat{H}_e)$ (NEI, 1978), a significância foi obtida por intervalos de confiança (95%) calculados por reamostragem *bootstrap*, com auxílio do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002).

As estatísticas F de Wright (WRIGHT, 1951), foram estimadas com auxílio do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002), que utiliza o método descrito por Weir e Cockerham (1984). Incluindo a distribuição da diversidade genética dentro das populações (F_{IS}), entre as populações (F_{ST}) e total (F_{IT}). A significância das estatísticas F foi obtida através do método de reamostragem *bootstrap*, com 1000 reamostragens e significância de 5%, também pelo programa FSTAT. Foi realizada também a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE, 1992; PEAKALL; SMOUSE; HUFF, 1995) para avaliar a distribuição da diversidade genética entre populações e indivíduos, com auxílio do programa GenAlEx (PEAKALL; SMOUSE, 2006; 2012). Foram calculadas para todas as populações as divergências genéticas (F_{ST}) par a par, para verificar a possível associação entre a divergência genética e a distância geográfica entre as populações, foi realizado um Teste de Mantel (1970), utilizando o logaritmo natural da distância geográfica e $F_{ST} / (1 - F_{ST})$, para todos os pares de populações e coortes.

Foram calculadas as matrizes de distância genética de Nei (1972), utilizadas para gerar um dendrograma através do método UPGMA, para verificação de algum padrão de agrupamento entre as populações, com auxílio do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001).

Os valores do número de migrantes (N_m) entre as populações foram calculados com auxílio do programa GenAlEx (PEAKALL; SMOUSE, 2006; 2012), utilizados para estimar o tamanho de vizinhança (N_b), ou o número médio de indivíduos reprodutivos por área de vizinhança, calculados conforme Wright (1931) e baseadas no modelo de isolamento por distância (SLATKIN; BARTON, 1989) $N_b = 2\pi N_m$.

Para o tamanho efetivo populacional (N_e) foi estimado conforme proposto por Li (1955) $N_e = n / (1 + f)$, em que n é o número de indivíduos da população e f é o índice de fixação da população. As estimativas de N_e para os valores de referência de 50 (FRANKEL; SOULÉ, 1981), 500 (FRANKLIN; FRANKHAM, 1998) e 1000 indivíduos (LYNCH; LANDE, 1998) foram obtidos pela multiplicação dos valores de referência pelos valores obtidos de n/N_e .

4.5 RESULTADOS

Com os 13 locos microssatélites utilizados na genotipagem, foram obtidos 177 alelos, para todas as populações adultas e regenerantes (Tabela 5). O número médio de alelos por locos foi de 7,83 alelos, variando de 2 a 18. Foi detectada a presença de alelos nulos em todos os locos microssatélites, todos com frequências significativas, exceto para um loco para as populações regenerantes (Tabela 6).

Os índices de diversidade genética obtidos para as populações de indivíduos adultos e regenerantes, para fins de comparação estão apresentados na Tabela 7. Em média as populações de indivíduos regenerantes apresentaram um número de alelos por loco ($A = 7,97$) maior em comparação com as adultas ($A = 7,70$), somente em duas populações regenerantes o número de alelos por loco foi menor que nas adultas (MR-R e SF-R).

Todas as populações apresentaram um número considerável de alelos raros ($\text{freq.} \leq 0,05$) (Tabela 7). Com exceção das populações MR-R e PL-A todas apresentaram pelo menos um alelo exclusivo, com um total de 22 alelos exclusivos, e estes também considerados como raros, as populações regenerantes apresentaram 2 alelos exclusivos a mais em comparação com as adultas.

Tabela 5 – Número de alelos encontrados em locos microssatélites em seis populações: PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL) de indivíduos adultos (A) e indivíduos regenerantes (R) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

Locos	Populações												Total
	MR-A	MR-R	CCO-A	CCO-R	PI-A	PI-R	SF-A	SF-R	TB-A	TB-R	PL-A	PL-R	
Ipg_49	12	8	12	12	12	11	17	15	18	17	11	14	24
Ipg_10	4	6	7	6	10	8	6	6	10	10	6	7	14
Ipg_06	6	7	6	7	9	7	8	13	10	11	9	10	15
Ipg_41	18	14	12	17	11	14	18	15	15	16	10	18	25
Ipg_19	4	5	7	8	7	9	5	4	6	6	6	7	11
Ipg_46	4	5	6	5	5	6	6	7	6	6	6	6	11
Ipg_01	10	12	11	16	10	13	15	11	11	13	14	12	19
Ipg_08	5	5	8	7	7	6	5	6	6	7	6	7	9
Ipg_03	6	6	7	8	11	8	9	7	10	9	5	5	13
Ipg_07	10	8	8	9	9	9	11	10	10	11	9	7	16
Ipg_28	6	3	5	5	4	8	6	5	6	7	5	4	12
Ipg_21	3	2	2	3	2	4	3	2	2	3	3	2	4
Ipg_22	2	3	3	3	3	3	3	4	2	2	3	3	4

PNM – Parque Natural Municipal; FLONA – Floresta Nacional; RPPNE - Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 6 – Frequência de alelos nulos presentes em cada loco microssatélite, pelo método Oosterhout et al. (2004), para as populações de indivíduos adultos e regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

Locos	Adultos	Regenerantes
Ipg_49	0,075*	0,190*
Ipg_10	0,079*	0,063*
Ipg_06	0,310*	0,266*
Ipg_41	0,188*	0,186*
Ipg_19	0,390*	0,305*
Ipg_46	0,280*	0,198*
Ipg_01	0,342*	0,319*
Ipg_08	0,103*	0,139*
Ipg_03	0,343*	0,302*
Ipg_07	0,058*	0,036
Ipg_28	0,219*	0,137*
Ipg_21	0,311*	0,329*
Ipg_22	0,139*	0,111*

* - presença de alelos nulos, significativo a 95%.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 7 – Valores médios dos índices de diversidade genética para as populações PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL) de indivíduos adultos (A) e regenerantes (R) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

	Populações							
	MR-A		MR-R		CCO-A		CCO-R	
A	6,9	[4,5 - 9,3]	6,5	[4,6 - 8,3]	7,2	[5,6 - 8,9]	8,2	[5,7 - 10,6]
A_e	3,6	[2,3 - 4,8]	3,2	[2,1 - 4,2]	3,4	[2,7 - 4,1]	4,0	[2,7 - 5,3]
I	1,3	[1,0 - 1,6]	1,2	[0,9 - 1,5]	1,4	[1,1 - 1,7]	1,5	[1,2 - 1,8]
H_o	0,419	[0,307 - 0,531]	0,414	[0,313 - 0,515]	0,375	[0,248 - 0,503]	0,397	[0,301 - 0,492]
H_e	0,632	[0,535 - 0,729]	0,584	[0,469 - 0,698]	0,640	[0,537 - 0,743]	0,660	[0,555 - 0,764]
f	0,347*	-	0,300*	-	0,424*	-	0,408*	-
A_r	35		38		37		46	
A_{ex}	2		-		2		1	
	PI-A		PI-R		SF-A		SF-R	
A	7,7	[5,9 - 9,5]	8,2	[6,4 - 9,9]	8,6	[5,8 - 11,4]	8,1	[5,7 - 10,4]
A_e	4,1	[3,1 - 5,1]	4,0	[3,1 - 4,9]	4,5	[2,9 - 6,1]	4,2	[3,0 - 5,4]
I	1,5	[1,2 - 1,8]	1,5	[1,3 - 1,8]	1,5	[1,2 - 1,9]	1,5	[1,2 - 1,8]
H_o	0,379	[0,235 - 0,523]	0,404	[0,290 - 0,518]	0,404	[0,267 - 0,542]	0,427	[0,296 - 0,557]
H_e	0,668	[0,543 - 0,793]	0,693	[0,605 - 0,781]	0,693	[0,601 - 0,785]	0,689	[0,600 - 0,778]
f	0,444*	-	0,426*	-	0,426*	-	0,390*	-
A_r	42		52		54		50	
A_{ex}	2		2		2		3	
	TB-A		TB-R		PL-A		PL-R	
A	8,6	[6,1 - 11,1]	9,1	[6,6 - 11,6]	7,2	[5,4 - 8,9]	7,8	[5,4 - 0,3]
A_e	5,0	[3,7 - 6,3]	4,7	[3,5 - 6,0]	3,2	[2,6 - 3,8]	4,5	[3,1 - 5,9]
I	1,6	[1,3 - 2,0]	1,6	[1,3 - 2,0]	1,4	[1,1 - 1,6]	1,6	[1,2 - 1,9]
H_o	0,419	[0,254 - 0,584]	0,458	[0,317 - 0,598]	0,415	[0,286 - 0,543]	0,445	[0,311 - 0,578]
H_e	0,719	[0,592 - 0,846]	0,704	[0,576 - 0,833]	0,653	[0,583 - 0,723]	0,703	[0,603 - 0,802]
f	0,428*	-	0,360*	-	0,374*	-	0,380*	-
A_r	44		56		42		44	
A_{ex}	2		1		-		5	

PNM – Parque Natural Municipal; FLONA – Floresta Nacional; RPPNE - Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual; A - número de alelos; A_e - número de alelos efetivos; I - índice de informação de Shannon; H_o - heterozigotidade observada; H_e - heterozigotidade esperada; f - índice de fixação; A_r - alelos raros e A_{ex} - alelos exclusivos. Intervalos de Confiança (95%) [lim. inferior – lim. superior]. *Valores significativamente diferentes de zero.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Os valores dos índices de diversidade de maneira geral foram altos e semelhantes para todas as populações, em termos médios as populações regenerantes apresentaram heterozigotidade esperada (H_e=0,672) e observada (H_o=0,424) maior que as adultas (H_e=0,668; H_o=0,402), o que conseqüentemente gerou uma redução no índice de fixação f=0,461 (seis populações adultas) para f=0,424 (seis populações regenerantes), todos positivos e significativamente diferente de zero.

De acordo com as análises para estrutura genética com as estatísticas F de Wright, foram obtidos índices de fixação (F_{IT}, F_{IS} e F_{ST}) positivos e significativamente diferentes de zero para o conjunto de populações tanto para os indivíduos adultos como para os regenerantes (Tabela 8). Quando comparadas as populações adultas com as regenerantes

foram verificadas diferenças significativas entre elas. De maneira geral os valores dos índices F para as populações regenerantes foram menores que as adultas.

Tabela 8 – Estatísticas F de Wright calculadas para seis populações de indivíduos adultos e seis populações de indivíduos regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

Populações	F_{IS} [IC 95%]	F_{ST} [IC 95%]	F_{IT} [IC 95%]
Adultas	0,406* [#] [0,256 - 0,557]	0,110* [#] [0,092 - 0,128]	0,471* [#] [0,334 - 0,607]
Regenerantes	0,376* [#] [0,256 - 0,490]	0,091* [#] [0,073 - 0,110]	0,433* [#] [0,320 - 0,539]
Total	0,391* [0,259 - 0,520]	0,095* [0,081 - 0,110]	0,449* [0,327 - 0,568]

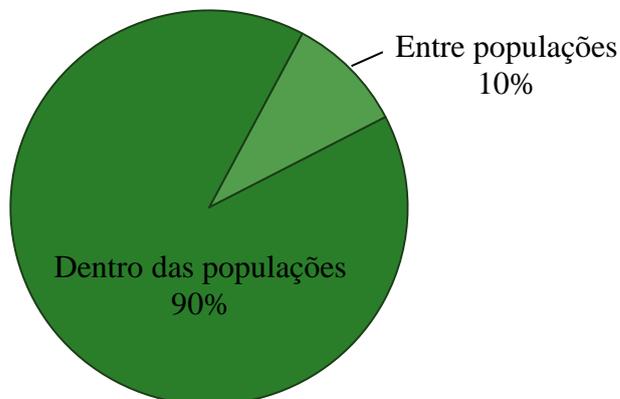
Intervalos de Confiança (95%) [lim. inferior – lim. superior]. *Valores significativamente diferentes de zero.
diferença significativa entre populações adultas e regenerantes.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A análise molecular da variância (AMOVA) indica que a maior proporção de variação genética é intrapopulacional e a menor variação é interpopulacional (Figura 12). Quando realizada a AMOVA separadamente para os níveis hierárquicos, foram encontradas diferenças significativas na distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações de indivíduos adultos e regenerantes. Diferenças significativas também foram observadas entre os grupos de indivíduos (Adultos vs. Regenerantes) (Tabela 9).

Figura 12 – Porcentagens da variação molecular obtidos pela AMOVA para populações de indivíduos adultos e regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil

Análise Molecular da Variância (AMOVA) Porcentagens da variância molecular



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 9 – Resultados da Análise Molecular da Variância (AMOVA) para seis populações de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos adultos e regenerantes, e entre grupos

Indivíduos Adultos					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Estimativa da Variância *	%
Entre populações	5	267,983	53,597	0,479	9%
Entre indivíduos^a	286	2004,955	7,010	2,285	44%
Dentro de indivíduos^b	292	712,500	2,440	2,440	47%
Indivíduos Regenerantes					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Estimativa da Variância *	%
Entre populações	5	247,606	49,521	0,438	9%
Entre indivíduos	289	1878,680	6,501	1,935	39%
Dentro de indivíduos	295	776,000	2,631	2,631	53%
Entre grupos de indivíduos (Adultos vs. Regenerantes)					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Estimativa da Variância *	%
PNM Teixeira Soares	1	12,670	12,670	0,069	2%
FLONA Chapecó	1	16,392	16,392	0,100	2%
P. Ilópolis	1	29,472	29,472	0,233	5%
RPPNE Serra da Farofa	1	19,560	19,560	0,127	3%
FLONA Três Barras	1	28,404	28,404	0,216	4%
P. Lacerdópolis	1	32,614	32,614	0,270	5%

*Nível de significância após 999 permutações: $p < 0,001$ para todas as análises. ^a análise entre indivíduos considera as populações MR, CCO, PI, SF, TB e PL; ^b análise dentro de indivíduos considera a variação dentro de apenas uma das populações por vez.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Na verificação das divergências genéticas pelos valores de F_{ST} par a par entre as populações, foram encontradas diferenças significativas entre as populações adultas (Tabela 10), entre as populações regenerantes (Tabela 11).

Também foram encontradas diferenças significativas na comparação entre os indivíduos adultos e regenerantes por área, exceto para MR e TB que não apresentaram diferença (Tabela 12).

Tabela 10 – Valores de divergência genética (F_{ST}) par a par, de seis populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos adultos (A) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

Populações	F_{ST}	Intervalo de Confiança (95%)
MR-A x CCO-A	0,104*	0,061 - 0,161
MR-A x PI-A	0,107*	0,078 - 0,142
MR-A x SF-A	0,157*	0,116 - 0,203
MR-A x TB-A	0,117*	0,080 - 0,158
MR-A x PL-A	0,171*	0,124 - 0,223
CCO-A x PI-A	0,069*	0,039 - 0,101
CCO-A x SF-A	0,115*	0,078 - 0,152
CCO-A x TB-A	0,093*	0,068 - 0,117
CCO-A x PL-A	0,061*	0,034 - 0,089
PI-A x SF-A	0,105*	0,064 - 0,153
PI-A x TB-A	0,069*	0,040 - 0,101
PI-A x PL-A	0,109*	0,067 - 0,154
SF-A x TB-A	0,082*	0,056 - 0,107
SF-A x PL-A	0,109*	0,069 - 0,145
TB-A x PL-A	0,114*	0,078 - 0,153

PNM – Parque Natural Municipal; FLONA – Floresta Nacional; RPPNE - Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual. Intervalos de Confiança (95%) [lim. inferior – lim. superior].

* - Valores significativamente diferentes de zero.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 11 – Valores de divergência genética (F_{ST}) par a par, de seis populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos regenerantes (R) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

Populações	F_{ST}	Intervalo de Confiança (95%)
MR-R x CCO-R	0,097*	0,055 - 0,152
MR-R x PI-R	0,094*	0,069 - 0,122
MR-R x SF-R	0,163*	0,121 - 0,210
MR-R x TB-R	0,131*	0,083 - 0,183
MR-R x PL-R	0,130	0,084 - 0,183
CCO-R x PI-R	0,055*	0,029 - 0,086
CCO-R x SF-R	0,109*	0,066 - 0,155
CCO-R x TB-R	0,065*	0,033 - 0,105
CCO-R x PL-R	0,043*	0,024 - 0,063
PI-R x SF-R	0,078*	0,058 - 0,099
PI-R x TB-R	0,055*	0,038 - 0,071
PI-R x PL-R	0,059*	0,038 - 0,079
SF-R x TB-R	0,097*	0,067 - 0,126
SF-R x PL-R	0,096*	0,068 - 0,124
TB-R x PL-R	0,059*	0,040 - 0,075

PNM – Parque Natural Municipal; FLONA – Floresta Nacional; RPPNE - Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual. Intervalos de Confiança (95%) [lim. inferior – lim. superior].

* - Valores significativamente diferentes de zero.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 12 – Valores de divergência genética (F_{ST}) par a par por populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] adultas (A) e regenerantes (R) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. na área

Populações	F_{ST}	Intervalo de Confiança (95%)	
Adultas x Regenerantes - Na área			
MR-A x MR-R	-0,001 ^{NS}	-0,006	0,005
CCO-A x CCO-R	0,013*	0,003	0,022
PI-A x PI-R	0,015*	0,002	0,034
SF-A x SF-R	0,028*	0,006	0,059
TB-A x TB-R	0,009 ^{NS}	-0,003	0,023
PL-A x PL-R	0,033*	0,018	0,048

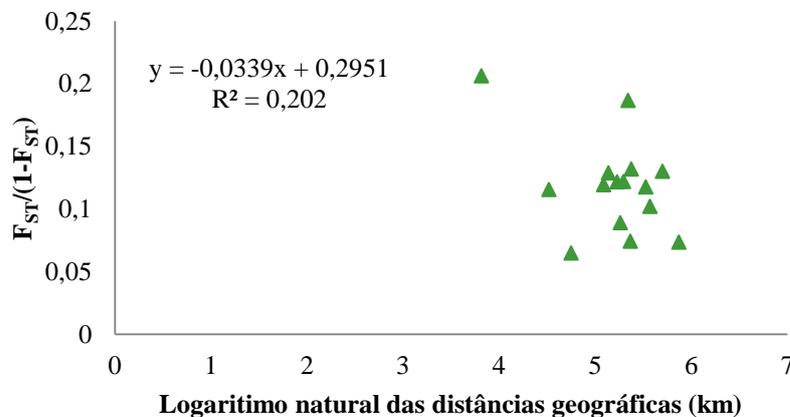
PNM – Parque Natural Municipal; FLONA – Floresta Nacional; RPPNE - Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual. Intervalos de Confiança (95%) [lim. inferior – lim. superior].

* - Valores significativamente diferentes de zero, ^{NS} - não significativo.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

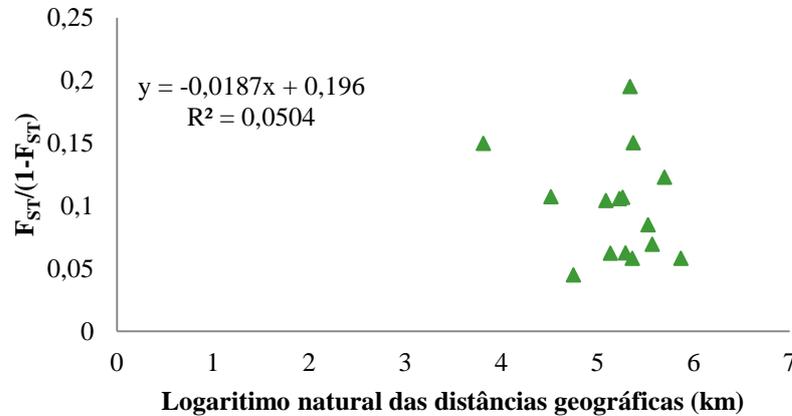
A divergência genética não tem correlação com a distância geográfica das populações de indivíduos de *I. paraguariensis* segundo as análises de correlação entre o Ln das distâncias geográficas e o $F_{ST}/(1-F_{ST})$, tanto para as populações de indivíduos adultos ($R^2=0,202$) (Figura 13) como para as populações de indivíduos regenerantes ($R^2=0,0504$) (Figura 14). Confirmado pelo cálculo das distâncias genéticas de Nei (1972) (Tabela 13), em que as distâncias genéticas das populações MR x PL (populações mais próximas geograficamente) são maiores que PI x TB (mais distantes geograficamente).

Figura 13 – Correlação de Mantel entre o logaritmo natural da distância geográfica e o $F_{ST}/(1-F_{ST})$ par a par para as populações de indivíduos adultos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Figura 14 – Correlação de Mantel entre o logaritmo natural da distância geográfica e o $F_{ST}/(1-F_{ST})$ par a par para as populações de indivíduos regenerantes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 13 – Matriz de distância genética de Nei (1972) (abaixo da diagonal principal) e matriz de identidade de Nei (1978) (acima da diagonal principal) para as populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos adultos (A) e regenerantes (R) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

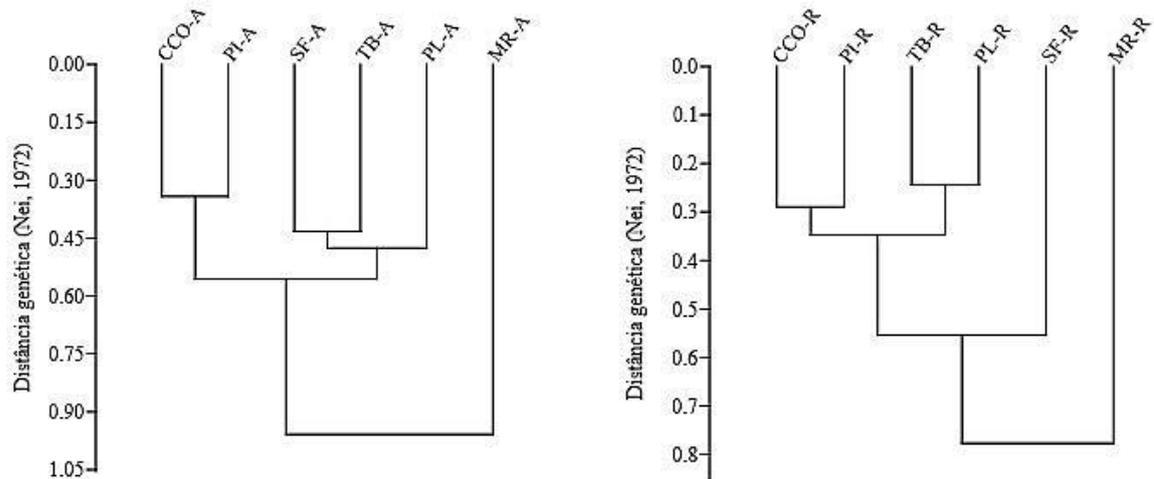
Pop	MR-A	MR-R	CCO-A	CCO-R	PI-A	PI-R	SF-A	SF-R	TB-A	TB-R	PL-A	PL-R
MR-A	-	0,998	0,783	0,855	0,761	0,836	0,613	0,695	0,711	0,753	0,609	0,780
MR-R	0,019	-	0,722	0,816	0,732	0,813	0,562	0,648	0,683	0,724	0,522	0,726
CCO-A	0,265	0,344	-	0,967	0,843	0,826	0,721	0,698	0,769	0,826	0,868	0,922
CCO-R	0,176	0,220	0,055	-	0,861	0,866	0,721	0,728	0,777	0,839	0,779	0,892
PI-A	0,297	0,334	0,195	0,173	-	0,952	0,726	0,771	0,812	0,849	0,744	0,852
PI-R	0,202	0,227	0,215	0,167	0,075	-	0,707	0,792	0,809	0,85	0,709	0,836
SF-A	0,511	0,596	0,350	0,350	0,347	0,371	-	0,923	0,764	0,762	0,732	0,756
SF-R	0,385	0,452	0,382	0,339	0,286	0,257	0,104	-	0,735	0,736	0,636	0,736
TB-A	0,368	0,406	0,29	0,279	0,239	0,241	0,298	0,337	-	0,965	0,701	0,801
TB-R	0,306	0,343	0,215	0,199	0,191	0,188	0,297	0,331	0,065	-	0,727	0,833
PL-A	0,516	0,668	0,162	0,270	0,321	0,367	0,334	0,474	0,382	0,341	-	0,919
PL-R	0,276	0,344	0,108	0,141	0,191	0,208	0,308	0,335	0,256	0,212	0,112	-

PNM – Parque Natural Municipal; FLONA – Floresta Nacional; RPPNE - Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

O dendrograma pelo método UPGMA, com base na estimativa da distância genética entre populações proposta por Nei (1972), para as populações de *I. paraguariensis* (Figura 15), mostra que o padrão de agrupamento para das populações CCO, PI e MR se mantem dos indivíduos adultos para os regenerantes. As populações TB, PL E SF apresentam alterações no agrupamento dos indivíduos adultos para os regenerantes.

Figura 15 – Dendrograma de distâncias genéticas de Nei (1972) através do método UPGMA para as populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos adultos (A) e indivíduos regenerantes (R) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.



PNM – Parque Natural Municipal; FLONA – Floresta Nacional; RPPNE - Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Em relação à estimativa do fluxo gênico ou número de migrantes por geração (Tabela 14), a média entre as seis populações de indivíduos adultos foi de $N_m=2,35$, e a média entre as seis populações de indivíduos regenerantes foi de $N_m=3,008$. Entre as populações de indivíduos adultos e regenerantes de áreas diferentes a média foi de $N_m=2,68$. Quanto ao número de indivíduos reprodutivos potencialmente aptos ao cruzamento que trocam genes ao acaso entre as populações (N_b), considerando o conjunto de seis populações de indivíduos adultos, tem-se uma média de aproximadamente 17 indivíduos.

Os valores encontrados para a estimativa do tamanho efetivo populacional foi inferior ao tamanho da amostra para todas as populações avaliadas (Tabela 15). O tamanho amostral médio foi de 49 indivíduos, e o tamanho efetivo amostral foi de 35 indivíduos. A população PI-A apresentou os maiores valores de referência e a população MR-R os menores valores de referência.

Tabela 14 – Matriz com valores de número de migrantes por geração (N_m) para as populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de indivíduos adultos (A) e regenerantes (R) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

Pop	MR-A	MR-R	CCO-A	CCO-R	PI-A	PI-R	SF-A	SF-R	TB-A	TB-R	PL-A	PL-R
MR-A	0,000											
MR-R	15,400	0,000										
CCO-A	3,079	1,651	0,000									
CCO-R	3,519	2,467	11,281	0,000								
PI-A	2,383	1,377	3,564	2,349	0,000							
PI-R	3,434	2,554	3,674	4,374	5,077	0,000						
SF-A	1,714	1,135	2,369	2,022	2,369	2,281	0,000					
SF-R	1,824	1,351	2,036	2,145	2,066	3,119	9,362	0,000				
TB-A	2,197	1,278	2,738	1,831	5,008	2,715	2,812	1,936	0,000			
TB-R	2,374	1,783	3,463	3,673	2,945	4,810	2,862	2,545	5,661	0,000		
PL-A	1,557	0,935	4,212	2,077	2,253	1,869	2,296	1,580	2,129	2,053	0,000	
PL-R	2,804	1,623	6,641	3,566	4,339	4,105	2,953	2,354	3,850	3,910	4,405	0,000

PNM – Parque Natural Municipal; FLONA – Floresta Nacional; RPPNE - Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 15 – Tamanho efetivo populacional (N_e) para valores de referência de 50, 500 e 1000 indivíduos para populações [PNM Teixeira Soares (MR), FLONA de Chapecó (CCO), Propriedade em Ilópolis (PI), RPPNE Serra da Farofa (SF), FLONA de Três Barras (TB) e Propriedade em Lacerdópolis (PL)] de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

População	n	f	N_e	n/N_e	$N_e 50$	$N_e 500$	$N_e 1000$
MR-A	49	0,347	36	1,347	67	674	1347
MR-R	50	0,300	38	1,300	65	650	1300
CCO-A	48	0,424	34	1,424	71	712	1424
CCO-R	50	0,408	36	1,408	70	704	1408
PI-A	46	0,444	32	1,444	72	722	1444
PI-R	50	0,426	35	1,426	71	713	1426
SF-A	50	0,426	35	1,426	71	713	1426
SF-R	50	0,390	36	1,390	70	695	1390
TB-A	49	0,428	34	1,428	71	714	1428
TB-R	50	0,360	37	1,360	68	680	1360
PL-A	50	0,374	36	1,374	69	687	1374
PL-R	45	0,380	33	1,380	69	690	1380
Média	49	0,392	35	1,392	70	696	1392
DP	1,730	0,042	1,847	0,042	2,109	21,093	42,186

PNM – Parque Natural Municipal; FLONA – Floresta Nacional; RPPNE - Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual. A - adultos; R - regenerantes. n - número de indivíduos amostrados da população; f - índice de fixação. * - Valores significativamente diferentes de zero. DP - desvio padrão.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

4.6 DISCUSSÃO

Dos 600 indivíduos coletados de *I. paraguariensis*, 13 indivíduos não foram utilizados nas análises, pois, não foi observada amplificação dos marcadores microssatélites nas reações de PCR e eletroforese capilar, provavelmente pela qualidade do DNA extraído, ou alguma característica intrínseca ao indivíduo. Um dos fatores que pode diminuir a qualidade do DNA extraído é a elevada quantidade de compostos secundários na composição das folhas da espécie (BISOGNIN et al., 2019; PIRES et al., 2016), o que ocasiona rápida oxidação.

A presença significativa de alelos nulos em todos os locos microssatélites utilizados neste estudo, exceto para o loco Ipg_07 nos indivíduos regenerantes, pode ter influenciado nos valores elevados dos índices de diversidade genética, superestimando a quantidade de genótipos homozigotos presentes nas populações. A presença desses alelos nulos pode ser devido à ocorrência de mutações nas sequências de nucleotídeos que flanqueiam os marcadores (CALLEN et al, 1993; DAKIN; AVISE, 2004; JARNE e LAGODA, 1996).

As frequências de alelos nulos para os marcadores microssatélites Ipg_06, Ipg_19, Ipg_46, Ipg_01, Ipg_03, Ipg_28 e Ipg_21, foram superiores a 20% (Tabela 6), o que segundo Dakin e Avise (2004) ultrapassa o limite recomendado. Conforme Stedille (2020) os marcadores Ipg_06, Ipg_19, Ipg_46, Ipg_01 também apresentaram frequências superiores a 20%, o que demonstra que esta característica pode ser intrínseca aos marcadores. Sendo que o Ipg_19 apresentou a maior frequência de alelos nulos, 39% para o presente estudo, assim como também observado por Stedille (2020) que obteve frequência de 41% para o mesmo marcador.

Para todas as populações de indivíduos adultos e regenerantes, o número médio de alelos por loco foi de 7,83, com amplitude de 2 a 18 alelos, de maneira geral o número de alelos por loco foi semelhante para as populações. As populações SF e TB, tanto para os indivíduos adultos e para os regenerantes, foram as que apresentaram o maior número de alelos por loco, e também foram as que apresentaram os maiores valores de H_o e H_e , no entanto, não houve diferença significativa entre elas (Tabela 7).

Em termos médios aproximadamente 44% dos alelos identificados nas populações possuem frequência $\leq 0,05$, e são considerados como raros. Alelos raros nas populações podem ser indicativos da ocorrência de mutação e ou seleção, ou seja, esses alelos podem ser novos mutantes que estão sendo selecionados positivamente ao longo do tempo; ou pode significar que são alelos “velhos” que estão sendo eliminados. Com exceção dos indivíduos regenerantes de MR e dos indivíduos adultos de PL, todas as populações apresentaram alelos

exclusivos, e todos com baixa frequência, classificados como raros. Pode-se notar que os indivíduos adultos de MR, CCO e TB apresentaram mais alelos exclusivos do que os indivíduos regenerantes, o que sugere a possível ocorrência de deriva genética (CARVALHO et al., 2010).

As três populações mencionadas (MR, CCO e TB) estão em áreas de conservação, sendo que a área do PNM Teixeira Soares no passado era pertencente a agricultores que cultivavam erva-mate, e as FLONAS (CCO e TB) possuem, nas proximidades da área coletada, bancos de germoplasma de *I. paraguariensis* implantados no passado pela EPAGRI.

Na área da propriedade particular em Lacerdópolis não foi observada a presença de alelos exclusivos nos indivíduos adultos, somente nos regenerantes (cinco), provavelmente devido ao enriquecimento com a espécie, realizado nas proximidades da área de coleta, e, a presença de áreas com plantios comerciais de *I. paraguariensis* que tem origem em sementes oriundas de outras áreas de ocorrência da espécie. Os indivíduos adultos que compõem a amostra estavam presentes na área anteriormente a intensificação nas atividades de uso da espécie na área de estudo, e, também atualmente os agricultores realizam manejo na área de forma a aumentar o número de indivíduos de *I. paraguariensis*, pois, tem como uma das atividades a exploração da erva-mate. Além disso, algumas áreas nos arredores são utilizadas com plantios de erva-mate, em que as mudas são oriundas também de outras áreas. Estes fatos podem explicar a presença de novos alelos nos indivíduos regenerantes.

Em uma análise geral a presença de alelos exclusivos e ou raros nas populações nos indivíduos adultos, requer atenção, pois, pode aumentar a possibilidade de perda da diversidade genética das populações, que com o tempo pode interferir na capacidade adaptativa da espécie (DEGEN; SEBBENN, 2014). A presença desses alelos exclusivos nos indivíduos adultos pode indicar a ausência ou baixo fluxo de alelos histórico entre estas populações (KAGEYAMA et al., 2003; SEOANE; KAGEYAMA; SEBBEN, 2000); ou ainda, pode ser consequência do aumento da fragmentação, que pode facilitar a deriva genética (DARDENGO; ROSSI; VARELLA, 2018) e ou a exploração não controlada no passado da espécie, que pode ter causado a perda de alelos em determinadas populações.

A presença de alelos exclusivos nos indivíduos regenerantes pode ser um indicativo da presença de fluxo gênico, ou seja, tem a chance de que estes alelos sejam oriundos de outros locais. Nas proximidades das áreas estudadas há plantios e populações espontâneas de *I. paraguariensis*, e estes indivíduos podem estar fornecendo pólen e ou sementes para as áreas amostradas. A entrada de pólen e ou sementes provenientes de outras áreas pode ser facilitada nas áreas de estudo, por se tratar de áreas de florestas naturais com diversos atrativos para as

espécies polinizadoras e dispersoras. De maneira geral, ressalta-se a importância e o papel fundamental destas áreas com a presença de alelos raros e ou exclusivos, em termos de conservação da espécie, principalmente as áreas de conservação FLONA de Três Barras e RPPNE Serra da Farofa e as propriedades particulares de Ilópolis e Lacerdópolis, que apresentam o maior número de alelos raros e exclusivos.

Quanto à diversidade genética, não foi observado diferença significativa para os índices de diversidade (H_o , H_e e f) entre as populações, tanto entre os indivíduos adultos ou regenerantes, quanto entre as áreas. Os valores de H_o encontrados foram menores que os esperados em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sugerindo um excesso de homozigotos nas populações, o que resultou em altos índices de fixação (f). Os valores de f para todas as populações estudadas foram elevados, positivos e significativamente diferentes de zero. Como mencionado anteriormente, esse excesso de homozigotos pode ser reflexo da presença significativa de alelos nulos. Por se tratar de uma espécie dióica e alógama esperava-se que os valores de índice de fixação para as populações fossem menores do que os encontrados. Os resultados obtidos de f indicam um possível aumento na endogamia, causado pelos cruzamentos entre indivíduos aparentados, o que pode ao longo do tempo causar efeitos negativos na capacidade adaptativa, produtiva e reprodutiva da espécie.

Uma explicação para os valores elevados dos índices de fixação pode ser a presença de estrutura genética espacial (EGE) dentro das populações. Trabalhos realizados com a erva-mate demonstraram que a espécie possui EGE, como, por exemplo, Seoane et al. (2019) observaram que em duas populações de *I. paraguariensis* na região Sudoeste do Paraná, os indivíduos adultos possuem EGE significativa (0-22m e 0-57m). O estudo recente realizado por Stedille (2020) confirma a presença de EGE em indivíduos adultos de *I. paraguariensis* até uma distância de 20 metros, sendo que esse estudo foi realizado em uma das áreas do presente estudo (SF).

Resultados com valores de índice de fixação elevados e excesso de indivíduos homozigotos também foram encontrados por Moura et al. (2009) para populações de *Solanum crinitum*, em que, para os autores a explicação pode ser dada pela existência de parentesco na população, ou pelas populações apresentarem o efeito de Wahlund, ou seja, a endogamia é causada pelo reflexo da deriva genética e subdivisão, este efeito é causado pela presença de estrutura genética espacial (EGE) dentro das populações. Outros autores como Carneiro et al. (2007), Bittencourt e Sebbenn (2007), para explicar os altos índices de fixação presente em espécies de reprodução cruzada, utilizam a hipótese de que o f calculado estaria medindo a

combinação dos efeitos da deriva genética com o sistema de reprodução ($f=F_{IT}$), pois, esta sendo superestimado pela presença de EGE.

Além disso, Stedille (2020) confirmou o padrão de distribuição espacial agregada para a espécie, o que pode contribuir com o aumento nos valores de f . Segundo Kageyama et al. (2003) espécies com distribuição espacial agregada e com dependência de polinização por insetos, tendem a apresentar proporções de indivíduos meio-irmãos e irmãos completos mais elevadas, pois, os insetos polinizadores podem visitar diversas árvores próximas antes de se distanciarem. Este fato pode também ser uma explicação para os valores do índice de fixação observado neste estudo para os indivíduos adultos (0,461) e para os indivíduos regenerantes (0,424), serem superiores ao esperado para irmãos completos ($f=0,25$).

Os índices de fixação (f) encontrados por Cascales et al. (2014) para *I. paraguariensis* foram elevados (0,457 e 0,342) corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Diferentemente para Pereira et al. (2013), os valores de f foram menores (0,094 e 0,107); assim como para Seonae et al. (2019), com os valores de f (-0,112 e 0,012).

Em termos de estrutura genética, os índices obtidos de F_{IT} , F_{IS} e F_{ST} para todas as populações foram positivos e significativamente diferentes de zero, os resultados indicam que como esperado para espécies alógamas, a distribuição da diversidade genética é maior dentro das populações ($F_{IS}=0,391$) do que entre as populações ($F_{ST}=0,095$), como encontrado na maioria dos trabalhos realizados com *I. paraguariensis* (CASCALES et al., 2014; GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; WENDT, 2005; WENDT et al., 2007; PEREIRA et al., 2013; SILVA, 2019). Por outro lado, Diaz (2013) encontrou resultados diferentes para a *I. paraguariensis*, sendo a divergência genética maior entre populações do que dentro, o autor sugere que esse resultado seja pelo grau de isolamento dos fragmentos avaliados, pois, na região estudada (arredores do Parque Nacional do Iguaçu), a matriz de paisagem é predominantemente de áreas de cultivo agrícola. Diferentemente das áreas estudadas no presente trabalho, que estão inseridas em uma paisagem que mantém um maior número de fragmentos florestais, em que a região tem em torno de 29% de cobertura florestal, constituída, em sua maioria, de fragmentos menores de 50 ha, como indicado pelo Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina. Estes fatos evidenciam a importância das áreas florestadas, que auxiliam na conectividade de fragmentos, para a manutenção do fluxo gênico e da variabilidade genética.

Houve diferenças significativas entre os indivíduos adultos e regenerantes com relação ao F_{IS} (Tabela 8), apresentando redução nos valores para os indivíduos regenerantes em comparação com os adultos. Foi observada baixa redução nos valores do F_{IS} , no entanto,

foi significativa ($F_{IS}=0,406$ adultas $\rightarrow F_{IS}=0,376$ regenerantes), o que pode ser um indicativo da presença de fluxo gênico via pólen e/ou sementes para estas áreas, auxiliando na conservação da diversidade genética da espécie. Os valores maiores de F_{IS} nos indivíduos adultos pode ser um indicativo dos eventos de exploração da espécie e fragmentação dos ambientes. Embora, os indivíduos regenerantes sejam provenientes de uma mistura de eventos reprodutivos, pode-se dizer que essa diminuição está atrelada ao aumento de fluxo gênico. A presença de plantios e populações espontâneas de erva-mate nas proximidades das áreas amostradas pode auxiliar no aumento do fluxo gênico e manutenção da variabilidade. A manutenção de uma paisagem com a presença de fragmentos florestais produtivos pode favorecer a conservação pelo uso das espécies presentes (REIS et al., 2018). Como, por exemplo, na região do Planalto Norte Catarinense, que os diferentes fragmentos conduzidos pelos agricultores (fazendas, e, também, a FLONA de Três Barras) formam uma ampla paisagem, que permite um alto nível de fluxo gênico entre as unidades, favorecendo a manutenção da diversidade genética de cada espécie presente e do todo, funcionando como uma metapopulação (REIS et al., 2018).

Os valores significativos de F_{IS} são um indicativo da existência de desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações, com excesso de indivíduos homocigotos. Este excesso pode ser consequência da presença de sobreposição de gerações, causada pela dormência das sementes, que aliado ao longo ciclo de vida da espécie, pode aumentar as possibilidades de cruzamentos entre indivíduos aparentados (FUTUYMA, 1992; KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998), pois, pode aumentar o tempo efetivo de cada geração.

A classificação da estatística F_{ST} segundo Wright (1978) representa alta diferenciação genética entre as populações quando os valores são superiores a 0,25. De modo geral, a divergência genética entre as populações estudadas foi baixa ($F_{ST}=0,110$ adultas $\rightarrow F_{ST}=0,091$ regenerantes), entretanto, significativa. A divergência genética é considerada como uma medida indireta de fluxo gênico (HARTL; CLARK 2010), com isso, a maioria dos resultados dos valores de F_{ST} par a par observados serem baixos indica que as populações avaliadas compartilham grande parte da diversidade genética total estimada, apontando para a presença de fluxo gênico histórico suficiente para contrapor os efeitos da deriva.

Das populações nos indivíduos adultos, 11% da diversidade genética não é compartilhada entre elas, o que pode ser reflexo da fragmentação florestal, que causa isolamento das populações e pode aumentar a diferenciação. Entretanto, houve redução na divergência das populações dos indivíduos adultos para os indivíduos regenerantes, 9,1% da diversidade genética não é compartilhada pelas populações nos indivíduos regenerantes,

embora essa redução seja baixa, ela é significativa, indicando que há aumento no fluxo gênico entre as populações de maneira geral, demonstrando que mesmo com as ações antrópicas, a espécie tem capacidade de conservação da variabilidade genética ao longo das gerações.

O uso da erva-mate é tradicional e histórico, e é inegável o fato de que a sua utilização, tanto de ervais nativos com ou sem enriquecimento, como de plantios, tem significativa importância econômica, social e cultural, e principalmente a importante contribuição para a conservação dos remanescentes florestais, e o aumento de conectividade entre fragmentos florestais (MARQUES; REIS; DENARDIN, 2019). Este fator pode ter elevada colaboração na redução observada nos valores de F_{ST} das populações dos indivíduos adultos para os regenerantes, com possível aumento de fluxo gênico, pois, como mencionado anteriormente, em todas as áreas amostradas, possuem áreas nos arredores com plantios de *I. paraguariensis*, realizados pelos agricultores, que praticam diferentes tipos de manejo, inclusive o enriquecimento das áreas de plantio com mudas provenientes de outras áreas. No entanto, cabe ressaltar que estes indivíduos regenerantes ainda estão passando pelo processo demográfico e há a possibilidade de que muitos destes não cheguem à fase adulta.

Na análise da AMOVA foi observado considerando todas as áreas que a maior variação está dentro das populações (90%). Entre as populações de indivíduos adultos e entre as populações de indivíduos regenerantes a variação foi significativa (9%). Quando avaliados os níveis hierárquicos (adultos vs. regenerantes) dentro das áreas, MR e CCO tem a menor variação (2%); a área SF e TB apresentaram 3% e 4% de variação, respectivamente. As propriedades particulares de Ilópolis e Lacerdópolis são as que apresentaram maior variação entre os níveis hierárquicos (5%). Estes resultados podem indicar que a forma de uso da área pode interferir na diversidade genética. As maiores variações entre os indivíduos adultos e regenerantes podem estar relacionadas com o enriquecimento e a presença de plantios nas proximidades da área, o que pode auxiliar no aumento de fluxo gênico.

Quando analisado o F_{ST} par a par das populações entre as áreas, tanto para os indivíduos adultos e regenerantes as divergências foram significativas. As menores divergências genéticas observadas foram entre a área da FLONA de Chapecó e a propriedade particular em Lacerdópolis, tanto nos indivíduos adultos como nos regenerantes ($F_{ST}=6\%$ adultos e $F_{ST}=4,3\%$ regenerantes). As maiores divergências observadas foram, entre o PNM Teixeira Soares e a propriedade particular em Lacerdópolis, com 17,1% de divergência nos indivíduos adultos; e, entre o PNM Teixeira Soares e a RPPNE Serra da Farofa, com 16,3% de divergência nos indivíduos regenerantes. Relacionando esses resultados de divergência genética com a distância geográfica entre as áreas, foi observado que não há correlação

significativa. Deste modo, os resultados obtidos no presente estudo diferem do modelo proposto por Wright (1943), em que o fluxo gênico é afetado pela distância, e que as populações mais próximas tendem a manter uma maior troca gênica. Este fato, no entanto, pode ser relativo ao local, uso e distribuição da espécie, pois, no estudo realizado por Cascales et al. (2014), houve correlação significativa entre a distância genética e geográfica em populações de *I. paraguariensis* no Uruguai.

Pouco da divergência genética é explicada pela distância geográfica nas áreas estudadas, como mencionado, o que sugere que essa pequena diferença, mas significativa, pode ser devido a possível deriva genética, ou alguma dificuldade no fluxo gênico entre as populações. O fluxo gênico pode ser dificultado pela forma de dispersão e polinização da espécie, a presença de assincronia dos eventos reprodutivos como diferenciação da gema floral, florescimento e frutificação. Segundo Sousa, Aguiar e Spoladore (2015) estes fatores podem limitar a troca gênica, podendo aumentar os cruzamentos entre indivíduos aparentados.

No estudo realizado por Kubiak et al. (2010) com indivíduos jovens e adultos de *I. paraguariensis* em um fragmento isolado, foi observado que mesmo isolado por área urbana o fragmento está mantendo a variabilidade genética da espécie, entretanto, os autores relatam que a persistência de populações em paisagens fragmentadas depende da manutenção da ligação entre fragmentos, impedindo o isolamento das mesmas.

Comparando os indivíduos adultos e regenerantes nas áreas, MR e TB não apresentaram diferenças significativas. Nas demais áreas as diferenças foram significativas, mas com valores baixos de divergência genética entre os indivíduos adultos e regenerantes 1,3% em CCO, 1,5% em PI, 2,8% em SF e 3,3% em PL. Os resultados obtidos evidenciam a manutenção da diversidade genética presente em *I. paraguariensis* nas áreas estudadas.

O tamanho efetivo populacional (N_e) é uma característica muito importante para a manutenção da diversidade e estrutura genética das populações ao longo das gerações (EGUIARTE et al., 1993; VENCOVSKY, 1987), que avalia o impacto devido a deriva genética (GASCA-PINEDA et al., 2013; MORAES; DERBYSHIRE, 2002). O tamanho efetivo estimado foi menor que o número de indivíduos amostrados para todas as populações, confirmando a presença de endogamia nas populações, causada pelo cruzamento entre indivíduos aparentados. Nas populações estudadas de *I. paraguariensis*, para se ter uma maior representatividade da diversidade das áreas, para um valor de referência de 50 indivíduos, seria necessário realizar a coleta em média de 70 indivíduos.

De modo geral, mesmo que tenham sido observados elevados valores de f , divergência genética entre populações significativas e valores de tamanho efetivo estimado reduzido, não

houve reduções drásticas nos valores de heterozigosidade ao longo das gerações. Mesmo com a presença de um cenário de fragmentação nas áreas, a diversidade genética se mantém para a espécie. Com isso, pode se dizer 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, porém, para estratégias de conservação da espécie em estudo recomenda-se conservar fragmentos de tamanho maior, e se possível com ligações entre fragmentos, para manutenção da variabilidade genética intrapopulacional.

4.7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois, todas as populações estudadas apresentaram valores de heterozigosidade observada menor que a esperada, demonstrando um excesso de indivíduos homozigotos.

Não houve diferença significativa para os índices de diversidade entre as populações, nem entre os indivíduos adultos e regenerantes nas áreas e entre áreas, porém com índices de fixação significativos e bastante elevados. Pode-se observar a manutenção da diversidade genética nas áreas ao longo das gerações.

A diversidade genética dos indivíduos regenerantes é menor entre as populações de *I. paraguariensis* do que dentro das populações nas áreas estudadas, seguindo o padrão esperado para a espécie. Desta forma, indicando que mesmo com a fragmentação florestal, é possível a manutenção da diversidade, pois, há a presença de fluxo gênico.

5 CAPÍTULO II

FLUXO GÊNICO ENTRE COORTES DE INDÍVIDUOS DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. EM DOIS REMANESCENTES FLORESTAIS

5.1 RESUMO

O fluxo gênico nas espécies vegetais é muito importante para a manutenção da diversidade genética das espécies. A fragmentação florestal pode causar limitações nos níveis de fluxo gênico entre as espécies, podendo ocasionar perda de diversidade genética. A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é uma espécie de grande importância e elevado consumo no Brasil. Com isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética, estrutura genética e fluxo gênico histórico e contemporâneo entre indivíduos de *Ilex paraguariensis* em remanescentes florestais de Floresta Ombrófila Mista, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com marcadores microssatélites desenvolvidos para espécie. Foram coletadas amostras foliares de 100 indivíduos, e frutos (quando presentes), abrangendo duas áreas de estudo [Floresta Nacional de Chapecó – SC (CCO); Parque Municipal Teixeira Soares – RS (MR)]. Foram coletadas amostras foliares de 50 indivíduos adultos, 50 indivíduos regenerantes por população, e frutos das matrizes quando presentes, respeitando a distância mínima de 50 m entre plantas (adultas) e 30 m (regenerantes), as plântulas foram obtidas após estratificação e germinação das sementes. As frequências alélicas mostraram a existência de alelos raros ($\text{freq.} \leq 5\%$) e alelos exclusivos nas coortes avaliadas em ambas as áreas. Observou-se uma tendência de aumento na heterozigosidade observada (H_o) nas coortes de regenerantes e sementes em relação a coorte de adultos na área CCO, o que gerou redução nos índices de fixação (f); ao contrário da área MR que se observou uma diminuição na H_o nas coortes de regenerantes e sementes em relação a coorte de adultos, o que aumentou os valores de f . Foram encontradas divergências significativas em ambas as áreas entre as coortes de adultos, regenerantes e de sementes, no entanto, não foi verificada divergência genética significativa entre a coorte de adultos e a coorte de regenerantes na área MR. Entre as áreas também foram observadas divergências significativas em todas as coortes avaliadas. Os resultados demonstram que há manutenção da diversidade genética na espécie ao longo das gerações. E não houve a redução de fluxo gênico considerável entre as populações de *I. paraguariensis* em relação ao passado. No entanto, ressalta-se a necessidade para melhor entendimento que seja realizado mais estudos, com mais eventos reprodutivos de sementes e preferencialmente com maior número de matrizes

coletadas e plântulas. Além disso, é de grande importância sempre lembrar a necessidade de conservação dos remanescentes florestais, bem como a conectividade entre fragmentos.

Palavras-chave: Erva-mate. Variabilidade genética. Fluxo gênico contemporâneo. Genética de populações. Fragmentação florestal.

5.2 ABSTRACT

Gene flow in plants is very important for maintaining the genetic diversity of species. Forest fragmentation can limit the levels of gene flow between species, which can lead to loss of genetic diversity. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) is a species of great importance and high consumption in Brazil. Thus, the present study aimed to evaluate the genetic diversity, genetic structure and historical and contemporary gene flow among individuals of *Ilex paraguariensis* in forest remnants of the Mixed Ombrophilous Forest, in the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, with developed microsatellite markers for species. Leaf samples were collected from 100 individuals, and fruits (when present), covering two study areas [Chapecó's National Forest – SC (CCO); Teixeira Soares Municipal Park – RS (MR)]. Leaf samples were collected from 50 adult individuals, 50 regenerating individuals per population, and fruits of the mother trees when present, respecting the minimum distance of 50 m between plants (adults) and 30 m (regenerating), the seedlings were obtained after the seed's stratification and germination. Allele frequencies showed the existence of rare alleles (freq. $\leq 5\%$) and exclusive alleles in the assessed cohorts in both areas. There was a trend towards an increase in the observed heterozygosity (H_o) in the cohorts of regenerating individuals and seeds in relation to the cohort of adults in the CCO area, which generated a reduction in the fixation indices (f); in contrast to the MR area, a decrease in H_o was observed in the cohorts of regenerating individuals and seeds in relation to the cohort of adults, which increased the values of f . Significant divergences were found in both areas between the cohorts of adults, regenerating individuals and seeds, however, there was no significant genetic divergence between the cohort of adults and the cohort of regenerating individuals in the MR area. Among the areas, significant divergences were also observed in all evaluated cohorts. The results demonstrate that there is maintenance of genetic diversity in the species over generations. Moreover, there was no considerable reduction in gene flow among *I. paraguariensis* populations compared to the past. However, it emphasizes the need for more studies to be carried out aiming a better understanding, with more seed reproductive events

and preferably with a greater number of collected mother trees and seedlings. Furthermore, it is of great importance to always remember the need for conservation of forest remnants, as well as the connectivity between fragments.

Keywords: Yerba mate. Genetic variability. Contemporary gene flow. Population genetics. Forest fragmentation.

5.3 INTRODUÇÃO

Historicamente as atividades de expansão territorial e exploração florestal geraram alterações nas florestas nativas brasileiras, resultando em um cenário atual da cobertura florestal com elevada fragmentação, principalmente o Bioma Mata Atlântica (ELIAS; PADILHA; SANTOS, 2016; VIBRANS et al., 2012).

A abrangência do Bioma se dá em grande parte ao longo da costa do Brasil, sendo que o estado de Santa Catarina está completamente inserido no Bioma (VIBRANS et al., 2012), e no Rio Grande do Sul está predominantemente nas regiões norte e nordeste (SFB, 2018); áreas que apresentam elevado grau de fragmentação (CARGNIN et al., 2019). A fragmentação leva a redução dos remanescentes florestais, que pode levar a redução e isolamento das populações presentes nestes locais. O isolamento pode causar a redução do fluxo gênico e favorecer a deriva genética, interferindo na diversidade genética das espécies, causando perda da variabilidade genética destas populações e interferindo na capacidade adaptativa das espécies (GRIFFITHS et al., 2017; SEBBENN et al., 2011).

O fluxo gênico, principalmente nas espécies florestais, é dependente de agentes polinizadores e dispersores das sementes, além de fatores muito importantes, como o tamanho da população que recebe o pólen e ou a semente, e a capacidade de fertilização e estabelecimento destes (ENNOS, 1994; SLATKIN, 1987). Análises de diversidade e estrutura genética populacional são algumas formas de quantificar o fluxo gênico entre populações. Ao comparar informações genéticas de indivíduos adultos com as informações de indivíduos regenerantes, obtemos por um método indireto, informações do fluxo gênico histórico (SLATKIN, 1987), pois, não se pode afirmar a qual evento reprodutivo aqueles indivíduos regenerantes pertencem. Por outro lado, ao se obter informações genéticas de pólen e ou plântulas provindas de sementes, consegue-se estimar o fluxo gênico contemporâneo, ou seja, daquele evento reprodutivo em questão (ENNOS, 1994; SLATKIN, 1987).

Para a criação de estratégias de conservação e uso das espécies e a manutenção da variabilidade genética, é muito importante o conhecimento da diversidade genética e como está distribuída nas populações remanescentes (PIRES et al., 2011; REIS et al., 2012), principalmente quando a espécie tem interesse além de ambiental, social, cultural e econômico, como a *I. paraguariensis* A. St. Hil., mais conhecida como erva-mate. Uma espécie de ampla utilização, das folhas e ramos na confecção de chás e bebidas estimulantes como o chimarrão (SOUZA; LORENZI, 2019), com o crescente uso medicinal (BRACESCO et al., 2011; CANSIAN et al., 2008), além de ornamental e ambiental (LORENZI, 2016), entre outros. Uma espécie dióica, com indivíduos com flores femininas e indivíduos com flores masculinas (PIRES et al., 2014), suas sementes apresentam dormência múltipla (CARVALHO, 2003; STURION; RESENDE, 2010), sendo necessária estratificação. A polinização é basicamente entomófila (FERREIRA et al., 1983; PIRES et al., 2014), e a dispersão é zoocórica, realizada principalmente por pequenos pássaros (DICKEL; RITTER; BARROS, 2011).

Dada a utilização, elevado consumo, e a exploração histórica da erva-mate, é de elevada importância estudos para obter informações da diversidade genética e principalmente dos níveis de fluxo gênico atual, para a manutenção da variabilidade e criação de estratégias para a conservação e seu uso. Com isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética, estrutura genética e fluxo gênico histórico e contemporâneo entre indivíduos de *Ilex paraguariensis* em dois remanescentes florestais de Floresta Ombrófila Mista.

Devido ao modo de reprodução da espécie ser alógama, ou seja, predominantemente por fecundação cruzada, as chances de troca de alelos são maiores, desta forma a diversidade genética dos indivíduos dentro de uma população é maior do que entre as populações. De modo geral, como a fragmentação florestal pode alterar cenários e isolar populações, busca-se responder se houve diminuição do fluxo gênico entre as populações de *I. paraguariensis* em relação ao passado. Além disso, o cenário avaliado no presente estudo abrange três estágios distintos, temos os adultos reprodutivos estabelecidos no local, que já passaram por todas as etapas demográficas e são responsáveis em sua maioria atualmente pela manutenção da estrutura e demográfica e diversidade genética; os indivíduos regenerantes que ainda estão passando pelo filtro demográfico, não estão reprodutivos e provavelmente são contribuições de vários eventos reprodutivos; e por fim, as mudas provenientes de sementes coletadas de um conjunto misto de indivíduos adultos femininos, de um evento reprodutivo específico (2017). Logo, as hipóteses são: (a) a diversidade genética é mantida da coorte de adultos para a de

sementes; (b) dentro de cada área a divergência genética entre coortes de adultos e sementes é menor do que entre coortes de regenerantes e sementes; (c) entre as áreas a divergência genética é semelhante entre as coortes de adultos e de sementes.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas coletas de amostras foliares de indivíduos adultos (reprodutivos) e regenerantes e a coleta de sementes de *I. paraguariensis* em dois remanescentes florestais, um no estado de Santa Catarina (Floresta Nacional de Chapecó) e um no Rio Grande do Sul (Parque Natural Municipal Mata do Rio Uruguai Teixeira Soares).

A coleta das amostras foliares dos indivíduos adultos e regenerantes foi realizada como descrito no Capítulo I. Além disso, foram coletados frutos (quando presentes) das matrizes adultas amostradas, dando preferência para os frutos maduros (coloração vermelha à purpura) (Figura 16A), estes frutos foram armazenados em sacos separados e identificados por matriz, até serem levados ao viveiro florestal da UDESC-CAV para as etapas seguintes.

Os frutos coletados foram lavados, após foi realizado o processo de extração da polpa e obtenção das sementes. As sementes foram colocadas para estratificação no viveiro florestal em bandejas com areia grossa, por sete meses. Após o período de estratificação as sementes foram colocadas para germinação (Figura 16C), e quando germinadas, as plântulas foram separadas para estabelecimento (Figura 16D; 16E), e para posterior extração de DNA. Foram genotipados e utilizados nas análises para área da FLONA de Chapecó 77 indivíduos de plântulas proveniente de sete matrizes, com quantidades de sementes similares de cada matriz. Para a área do Parque Natural Municipal Mata do Rio Uruguai Teixeira Soares foram genotipados e utilizados nas análises 56 indivíduos de plântulas provenientes de nove matrizes, com quantidades de sementes similares de cada matriz.

As demais etapas de extração de DNA, amplificação, genotipagem dos indivíduos, e análise dos dados foram realizadas conforme descrito no Capítulo I.

Figura 16 – Processo de obtenção das plântulas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., em que: (A) aspecto dos frutos coletados; (B) sementes separadas após estratificação com areia; (C) sementes colocadas para germinação; (D e E) plântulas separadas por matriz após germinação



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

5.5 RESULTADOS

Foram obtidos 131 alelos, para as populações, com os 13 locos microssatélites utilizados na genotipagem (Tabela 16). Obteve-se média de 7,10 alelos por locos, variando de 2 a 18. Em relação aos alelos nulos, não foi identificada presença somente em dois locos (Ipg_10 e Ipg_07), nos demais houve a presença de alelos nulos, com frequência significativa, exceto para os locos Ipg_08 e Ipg_22, nas áreas de MR e CCO, respectivamente (Tabela 17).

Tabela 16 – Número de alelos encontrados em locos microssatélites em coortes de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. na FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR)

Locos	Ad CCO	Reg CCO	Se CCO	Ad MR	Reg MR	Se MR	Total
IPG_49	12	12	13	12	8	8	16
IPG_10	7	6	5	4	6	3	7
IPG_06	6	7	10	6	7	7	10
IPG_41	12	17	15	18	14	15	21
IPG_19	7	8	6	4	5	6	9
IPG_46	6	5	5	4	5	4	6
IPG_01	11	16	14	10	12	12	19
IPG_08	8	7	6	5	5	5	8
IPG_03	7	8	7	6	6	5	8
IPG_07	8	9	8	10	8	7	11
IPG_28	5	5	6	6	3	3	9
IPG_21	2	3	2	3	2	2	4
IPG_22	3	3	3	2	3	3	3

Ad - Adultos; Reg - Regenerantes; Se – sementes; FLONA - Floresta Nacional; PNM - Parque Natural Municipal.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 17 – Frequência de alelos nulos presentes em cada loco microssatélite, pelo método Oosterhout et al. (2004), para as coortes de indivíduos *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR)

Locos	CCO	MR
Ipg_49	0,088*	0,114*
Ipg_10	0,028	0,052
Ipg_06	0,279*	0,292*
Ipg_41	0,191*	0,202*
Ipg_19	0,391*	0,196*
Ipg_46	0,226*	0,084*
Ipg_01	0,256*	0,285*
Ipg_08	0,081*	-0,016
Ipg_03	0,378*	0,296*
Ipg_07	0,036	-0,018
Ipg_28	0,136*	0,101*
Ipg_21	0,279*	0,250*
Ipg_22	0,053	0,085*

* presença de alelos nulos, significativo a 95%.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Os índices de diversidade genética obtidos para as coortes estão apresentados na Tabela 17, e as frequências alélicas para as coortes de indivíduos para as populações estão representadas na Figura 17. Em termos médios os valores de A e A_e foram maiores para as coortes de regenerantes e de sementes em relação a coorte dos adultos na população CCO, e menores na população MR. Aproximadamente 30% dos alelos obtidos, são considerados raros, pois, apresentam frequência $\leq 0,05$. As coortes na área CCO apresentaram mais alelos exclusivos que as coortes na área MR, quando realizada análise geral.

Não houve diferenças significativas entre as coortes para os índices de diversidade. Em geral foram altos e semelhantes para todas as populações. Observou-se uma tendência de aumento na heterozigosidade observada (H_o) nas coortes de regenerantes e sementes em relação a coorte dos adultos na população CCO, o que gerou redução nos índices de fixação (f); ao contrário da população MR que se observou uma diminuição na H_o nas coortes de regenerantes e sementes em relação a coorte dos adultos, o que aumentou os valores de f . Sendo todos os valores positivos e significativamente diferentes de zero.

Tabela 18 – Valores médios dos índices de diversidade genética para as coortes de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR)

	Ad CCO	Reg CCO	Se CCO	Ad MR	Reg MR	Se MR
N	48	50	77	49	50	56
A	7,2 [5,6 - 8,9]	8,2 [5,7 - 10,6]	7,7 [5,4 - 9,9]	6,9 [4,5 - 9,3]	6,5 [4,6 - 8,3]	6,2 [4,1 - 8,2]
A_e	3,4 [2,7 - 4,1]	4,0 [2,7 - 5,3]	3,8 [2,6 - 4,9]	3,6 [2,3 - 4,8]	3,2 [2,1 - 4,2]	3,5 [2,4 - 4,7]
I	1,4 [1,1 - 1,7]	1,5 [1,2 - 1,8]	1,4 [1,1 - 1,7]	1,3 [1,0 - 1,6]	1,2 [0,9 - 1,5]	1,3 [1,0 - 1,6]
H_o	0,375 [0,248 - 0,503]	0,397 [0,301 - 0,492]	0,386 [0,258 - 0,515]	0,419 [0,307 - 0,531]	0,414 [0,313 - 0,515]	0,408 [0,288 - 0,527]
H_e	0,640 [0,537 - 0,743]	0,660 [0,555 - 0,772]	0,639 [0,527 - 0,750]	0,632 [0,535 - 0,729]	0,584 [0,469 - 0,698]	0,624 [0,515 - 0,733]
f	0,424*	0,408*	0,401*	0,347*	0,300*	0,356*
A_{ex}	3	4	4	5	2	1

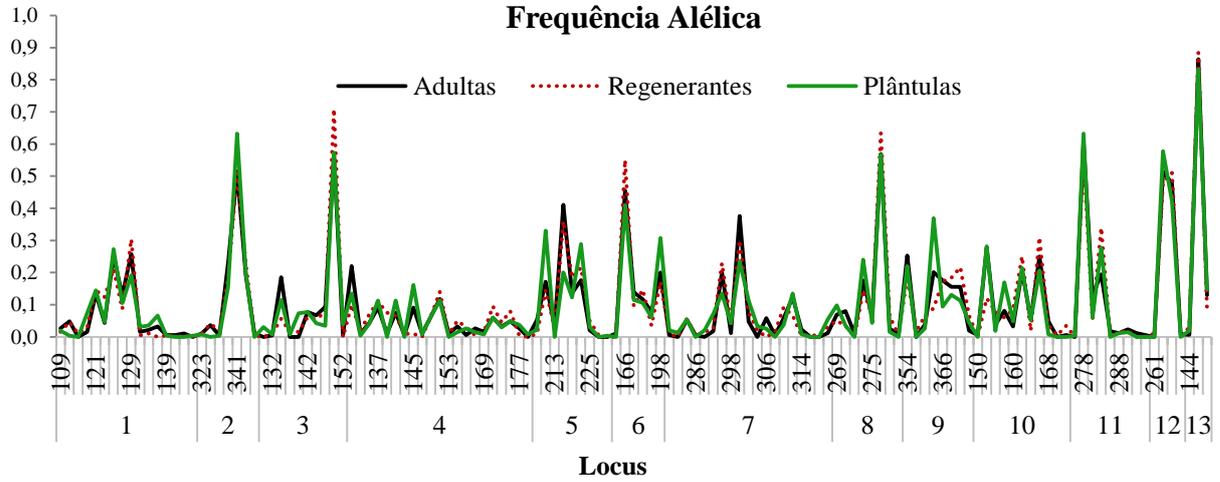
Ad - Adultos; Reg - Regenerantes; Se - sementes. FLONA - Floresta Nacional; PNM - Parque Natural Municipal. N - número de indivíduos; A - número de alelos; A_e - número de alelos efetivos; I - índice de informação de Shannon; H_o - heterozigosidade observada; H_e - heterozigosidade esperada; f - índice de fixação e A_{ex} - alelos exclusivos. Intervalos de Confiança (95%) [lim. inferior – lim. superior].

*Valores significativamente diferentes de zero.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Figura 17 – Frequência alélica nos locos microssatélites para as coortes de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira

Soares (MR)



1- Ipg_49; 2- Ipg_10; 3- Ipg_06; 4- Ipg_41; 5- Ipg_19; 6- Ipg_46; 7- Ipg_01;
8- Ipg_08; 9- Ipg_03; 10- Ipg_07; 11- Ipg_28; 12- Ipg_21; 13- Ipg_22.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Ao realizar análise dos alelos por área, foram observados mais alelos exclusivos na área MR em relação à CCO, sendo a maioria desses alelos considerados como raros ($\text{freq.} \leq 0,05$) (Tabela 19). Na área CCO foram encontrados mais alelos exclusivos nas coortes de regenerantes (10) e sementes (6) do que na coorte de adultos (4). Na área MR foram encontrados mais alelos exclusivos na coorte dos adultos (12) do que nas coortes de regenerantes (10) e de sementes (4).

Tabela 19 – Frequência de alelos exclusivos para locos microssatélites em relação às coortes de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR)

Área	Pop/Coorte	Loco	Alelo	Frequência	Área	Pop/Coorte	Loco	Alelo	Frequência
CCO	Ad	Ipg_49	141	0,011	MR	Ad	Ipg_49	109	0,042
	Ad	Ipg_10	353	0,021		Ad	Ipg_49	135	0,010
	Ad	Ipg_46	148	0,023		Ad	Ipg_49	139	0,010
	Ad	Ipg_08	272	0,022		Ad	Ipg_41	153	0,021
	Reg	Ipg_41	139	0,110		Ad	Ipg_41	177	0,021
	Reg	Ipg_41	153	0,020		Ad	Ipg_01	306	0,091
	Reg	Ipg_41	163	0,020		Ad	Ipg_03	375	0,024
	Reg	Ipg_19	227	0,010		Ad	Ipg_07	150	0,011
	Reg	Ipg_01	308	0,010		Ad	Ipg_28	284	0,038
	Reg	Ipg_01	314	0,010		Ad	Ipg_28	302	0,025
	Reg	Ipg_01	316	0,010		Ad	Ipg_28	308	0,013
	Reg	Ipg_03	357	0,011		Ad	Ipg_21	267	0,014
	Reg	Ipg_07	170	0,010		Reg	Ipg_49	115	0,021
	Reg	Ipg_21	261	0,021		Reg	Ipg_10	335	0,010
	Se	Ipg_49	155	0,007		Reg	Ipg_10	353	0,010
	Se	Ipg_06	130	0,052		Reg	Ipg_19	213	0,010
	Se	Ipg_06	132	0,013		Reg	Ipg_19	225	0,030
	Se	Ipg_41	179	0,013		Reg	Ipg_46	196	0,030
	Se	Ipg_01	282	0,007		Reg	Ipg_01	294	0,031
	Se	Ipg_28	272	0,006		Reg	Ipg_01	318	0,010
				Reg	Ipg_03	357	0,023		
				Reg	Ipg_28	288	0,020		
				Se	Ipg_06	136	0,009		
				Se	Ipg_19	203	0,027		
				Se	Ipg_19	229	0,009		
				Se	Ipg_01	282	0,022		

Ad - Adultos; Reg - Regenerantes; Se – Sementes; FLONA - Floresta Nacional; PNM - Parque Natural Municipal.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

De acordo com as análises das estatísticas F de Wright foi verificada a presença de estruturação genética significativa nas coortes de indivíduos de *I. paraguariensis* nas áreas CCO e MR. Os índices de fixação total (F_{IT}) e dentro (F_{IS}) das populações foram positivos e significativamente diferentes de zero para as duas áreas (Tabela 20).

A análise molecular da variância (AMOVA) indica que a menor proporção de variação genética é entre as coortes de indivíduos, e a maior é dentro e entre os indivíduos (Figura 18), considerando as populações estudadas. Essa variação se mantém quando realizada a análise entre as coortes dentro de cada área (Tabela 21 e 22).

Tabela 20 – Estatísticas F de Wright calculadas para os indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR)

Área	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
CCO	0,408* [0,262 - 0,558]	0,420* [0,273 - 0,567]	0,019* [0,011 - 0,025]
MR	0,333* [0,199 - 0,462]	0,339* [0,207 - 0,466]	0,009* [0,004 - 0,013]
Geral	0,374* [0,239 - 0,549]	0,419* [0,285 - 0,549]	0,072* [0,045 - 0,110]

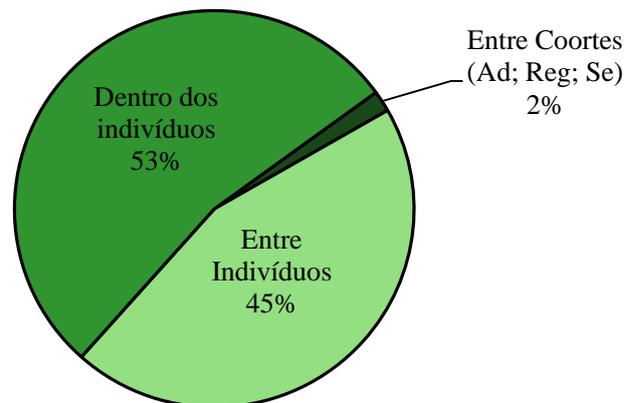
Intervalos de Confiança (95%) [lim. inferior – lim. superior].
FLONA - Floresta Nacional; PNM - Parque Natural Municipal.

* - Valores significativamente diferentes de zero.

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 18 – Porcentagens da variação molecular obtidos pela AMOVA para coortes de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil nas áreas da FLONA de Chapecó e PNM Teixeira Soares

Análise Molecular da Variância (AMOVA)
Porcentagens da variância molecular



Ad - adultos; Reg - regenerantes; Se - sementes.

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 21 – Resultados da Análise Molecular da Variância (AMOVA) para coortes de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. na área da FLONA de Chapecó

FLONA de Chapecó					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Estimativa da Variância *	%
Entre coortes (Ad;Reg;Se)	2	34,847	17,424	0,096	2%
Entre indivíduos	172	1120,873	6,517	2,045	45%
Dentro de indivíduos	175	424,500	2,426	2,426	53%
Total	349	1580,220		4,567	100%

*Nível de significância após 999 permutações: $p < 0,001$ para todas as análises. Ad - adultos; Reg - regenerantes; Se - sementes. ^a análise entre indivíduos considera as coortes; ^b análise dentro de indivíduos considera a variação dentro de apenas uma coorte por vez.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 22 – Resultados da Análise Molecular da Variância (AMOVA) para coortes de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. na área do PNM Teixeira Soares

PNM Teixeira Soares					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Estimativa da Variância *	%
Entre coortes (Ad;Reg;Se)	2	28,134	14,067	0,078	2%
Entre indivíduos	152	915,646	6,024	1,730	40%
Dentro de indivíduos	155	397,500	2,565	2,565	59%
Total	309	1341,281		4,372	100%

*Nível de significância após 999 permutações: $p < 0,001$ para todas as análises. Ad - adultos; Reg - regenerantes; Se - sementes. ^a análise entre indivíduos considera as coortes; ^b análise dentro de indivíduos considera a variação dentro de apenas uma coorte por vez.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Quando realizada a AMOVA entre as áreas estudadas, foram encontradas diferenças significativas na distribuição da diversidade genética entre as coortes, entre indivíduos e dentro dos indivíduos (Tabela 23).

Tabela 23 – Resultados da Análise Molecular da Variância (AMOVA) para as coortes de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. entre as áreas da FLONA de Chapecó e do PNM Teixeira Soares

Entre Áreas					
Coorte de Adultos					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Estimativa da Variância *	%
Entre populações	1	42,821	42,821	0,372	8%
Entre indivíduos	95	641,472	6,752	2,173	44%
Dentro de indivíduos	97	233,500	2,407	2,407	49%
Total	193	917,794		4,952	100%
Coorte de Regenerantes					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Estimativa da Variância *	%
Entre populações	1	47,945	47,945	0,422	9%
Entre indivíduos	98	562,020	5,735	1,570	34%
Dentro de indivíduos	100	259,500	2,595	2,595	57%
Total	199	869,465		4,587	100%
Coorte de Sementes					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Estimativa da Variância *	%
Entre populações	1	55,594	55,594	0,380	8%
Entre indivíduos	131	833,027	6,359	1,943	41%
Dentro de indivíduos	133	329,000	2,474	2,474	52%
Total	265	1217,620		4,796	100%

*Nível de significância após 999 permutações: $p < 0,001$ para todas as análises.

^a análise entre indivíduos considera as populações CCO e MR; ^b análise dentro de indivíduos considera a variação dentro de apenas uma das populações por vez.

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Foram verificadas divergências genéticas significativas pelos valores de F_{ST} par a par (Tabela 24) entre as coortes de adultos e de regenerantes, de adultos e de sementes, como também entre as coortes regenerantes e sementes na área CCO. Foram encontradas divergências significativas entre a coorte de adultos e de sementes e entre a coorte de regenerantes e de sementes, no entanto, não foi verificada divergência genética significativa entre a coorte de adultos e a coorte de regenerantes na área MR. Também foram encontradas divergências significativas entre as coortes entre as áreas.

Em relação à estimativa do fluxo gênico ou número de migrantes, a média entre as áreas foi de $N_m=2,77$. O número de migrantes entre as áreas para as coortes se manteve em aproximadamente $N_m=3$.

Quanto ao número de indivíduos reprodutivos potencialmente aptos ao cruzamento que trocam genes ao acaso (N_b) entre as coortes de adultos nas áreas, obteve-se uma média de aproximadamente 19 indivíduos.

Tabela 24 – Valores de divergência genética (F_{ST}) par a par para as coortes de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. e áreas [FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira

Soares (MR)]

	F_{ST}	Intervalo de confiança (95%)
Entre gerações CCO		
Ad CCO x Reg CCO	0,013*	[0,003 - 0,022]
Ad CCO x Se CCO	0,014*	[0,003 - 0,025]
Reg CCO x Se CCO	0,026*	[0,016 - 0,035]
Entre gerações MR		
Ad MR x Reg MR	-0,001 ^{ns}	[-0,006 - 0,004]
Ad MR x Se MR	0,010*	[0,002 - 0,020]
Reg MR x Se MR	0,017*	[0,009 - 0,024]
Entre áreas		
Ad CCO x Ad MR	0,104*	[0,061 - 0,161]
Reg CCO x Reg MR	0,097*	[0,055 - 0,153]
Se CCO x Se MR	0,101*	[0,052 - 0,171]
Ad CCO x Reg MR	0,144*	[0,094 - 0,207]
Ad CCO x Se MR	0,096*	[0,047 - 0,159]
Ad MR x Reg CCO	0,068*	[0,034 - 0,117]
Ad MR x Se CCO	0,114*	[0,063 - 0,180]
Reg CCO x Se MR	0,066*	[0,030 - 0,118]
Reg MR x Se CCO	0,148*	[0,096 - 0,215]

Ad - Adultos; Reg - Regenerantes; Se - Sementes. FLONA - Floresta Nacional; PNM - Parque Natural Municipal. Intervalos de Confiança (95%) [lim. inferior – lim. superior].

* - Valores significativamente diferentes de zero.

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Em termos de distância genética, não houve alteração na área CCO da coorte de adultos em relação às coortes de regenerantes e de sementes. Já na área MR houve aumento na distância genética entre a coorte de adultos e de regenerantes em relação a coorte de adultos e de sementes. Entre áreas as maiores distâncias genéticas identificadas foram entre a coorte de adultos de CCO e a coorte de regenerantes de MR; e entre a coorte de regenerantes de MR e a coorte de sementes de CCO (Tabela 25).

Tabela 25 – Matriz de distância genética de Nei (1972) (abaixo da diagonal principal) e matriz de identidade de Nei (1978) (acima da diagonal principal) para as coortes de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. nas áreas da FLONA de Chapecó (CCO) e no PNM Teixeira Soares (MR)

Pop/Coorte	Ad CCO	Reg CCO	Se CCO	Ad MR	Reg MR	Se MR
Ad CCO		0,947	0,951	0,767	0,709	0,79
Reg CCO	0,034		0,929	0,838	0,802	0,847
Se CCO	0,034	0,058		0,751	0,704	0,784
Ad MR	0,245	0,157	0,270		0,981	0,958
Reg MR	0,326	0,203	0,338	0,002		0,954
Se MR	0,217	0,148	0,229	0,025	0,031	

Ad - Adultos; Reg - Regenerantes; Se – Sementes;
 FLONA - Floresta Nacional; PNM - Parque Natural Municipal.
 Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5.6 DISCUSSÃO

O número de indivíduos utilizados, como matrizes de sementes para as análises do presente estudo, foi inferior ao número de indivíduos coletados, fato que ocorreu principalmente pela dormência múltipla da semente da espécie (STURION; RESENDE, 2010). Mesmo com a estratificação das sementes que durou aproximadamente sete meses, comparado ao número de sementes colocadas para germinação a quantidade de sementes que obtiveram sucesso na germinação foi baixo. E, notou-se também a dificuldade de estabelecimento das plântulas após a germinação. De acordo com Futuyma (1992) e Kageyama, Gandara e Souza (1998) a dormência de sementes pode contribuir com o aumento da endogamia nas populações, devido a possível sobreposição de gerações.

A presença significativa de alelos nulos na maioria dos locos microssatélites utilizados, também pode ter influenciado nos valores elevados dos índices de diversidade genética. Desta forma o número de genótipos homozigotos presentes nas populações pode ter

sido superestimando. Alguns dos marcadores microssatélites apresentaram frequências de alelos nulos superiores ao recomendado (>20%) (DAKIN; AVISE, 2004). Outros trabalhos utilizando os mesmos marcadores também identificaram frequências elevadas de alelos nulos (SILVA, 2019; STEDILLE, 2020).

Os valores observados para os índices de diversidade genética para as populações e suas coortes, de maneira geral foram similares. Não houve diferenças significativas para os valores de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) entre áreas e coortes, e os valores do índice de fixação (f) foram positivos e significativos. Estes resultados sugerem que as populações estão em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. De forma geral, a diversidade genética é mantida da coorte de adultos para a coorte de sementes, em ambas as áreas, demonstrando a capacidade da manutenção da diversidade genética destes indivíduos adultos que compõem as áreas de estudo.

As frequências alélicas não sofreram grandes alterações ao longo das gerações, o que sugere baixa atuação de deriva genética nas populações estudadas. Desta forma, uma explicação para os valores elevados de índice de fixação encontrados pode ser o aumento de endocruzamentos, ou seja, o aumento de cruzamentos entre indivíduos aparentados. O endocruzamento por si só não altera as frequência alélicas, alterando apenas as frequências genotípicas, elevando conseqüentemente o número de indivíduos homozigotos (SOUZA; TONI; CORDEIRO, 2011).

Observou-se que na área da FLONA de Chapecó existe uma tendência de aumento no número de indivíduos heterozigotos nas coortes de regenerantes e de sementes em relação à coorte de adultos. Este fato provavelmente é responsável pela redução no valor de f , indicando um aumento nas taxas de cruzamentos entre indivíduos não aparentados e ou aumento nas taxas de entrada pólen e sementes provenientes de outras áreas. A capacidade de germinação das sementes e estabelecimento dos indivíduos demonstra a capacidade de manutenção da espécie nesta área.

Cabe ressaltar que na área da FLONA existem bancos de germoplasma de *I. paraguariensis* que foram implantados pela EPAGRI no passado, nas proximidades da área onde foram realizadas as coletas. Muitos dos indivíduos adultos que compõem as áreas onde foram realizadas as coletas, já estavam presentes anteriormente a implantação destes bancos de germoplasma. Tem-se a possibilidade de que os indivíduos dos bancos de germoplasma possam estar contribuindo para o aumento da diversidade. Deve-se lembrar de que estes indivíduos regenerantes ainda estão passando pelos filtros demográficos, ou seja, alguns destes podem não chegar ao estágio reprodutivo. Desta forma, pode haver interferência na

diversidade genética ao longo das gerações, pois, podem ocorrer perdas de alelos, principalmente se for algum alelo exclusivo a essa coorte.

Segundo dados do IBGE, há um aumento na produção de erva-mate na região de Chapecó e Guatambu, e um grande número de áreas nos arredores da FLONA com plantios de finalidade comercial da espécie. Estes fatores podem contribuir com o aumento da diversidade nesta área, auxiliando no fluxo gênico, o que pode explicar a tendência de aumento no número de indivíduos heterozigotos, e a presença de mais alelos exclusivos nas coortes de regenerantes e de sementes, em relação a coorte de adultos na área.

Na área do Parque Natural Municipal Teixeira Soares, observou-se que houve tendência à diminuição nos indivíduos heterozigotos nas coortes de regenerantes e de sementes em relação à coorte de adultos. Gerando assim um aumento nos índices de fixação, indicando além do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, um possível aumento nos cruzamentos entre indivíduos aparentados. O maior aumento no valor de f observado foi entre a coorte de adultos e de sementes. Os maiores valores de H_o e H_e encontrados foi na coorte de adultos, indicando a diversidade genética histórica da espécie neste local, e a possibilidade de manutenção da diversidade futura, já que são estes indivíduos que estão reprodutivos atualmente.

Mesmo com poucas sementes germinadas, os resultados obtidos para este evento reprodutivo em específico indicam a manutenção da diversidade no local. Embora, o valor de f tenha aumentado na coorte de sementes em relação à coorte de adultos, este aumento não foi significativo. Os alelos exclusivos presentes na coorte de sementes, que podem ser provenientes de outras áreas, indicam a capacidade de manutenção da diversidade e presença de fluxo gênico. Recomenda-se que para trabalhos futuros sejam realizadas análises com mais indivíduos como matrizes, e com maior número de plântulas provenientes de sementes, para uma maior representatividade da população, pois, tem a possibilidade de que as sementes utilizadas não amostraram todos os cruzamentos possíveis. O maior número de alelos exclusivos na coorte de adultos, pode ser um indicativo da ocorrência de deriva genética (CARVALHO et al., 2010), ou reflexo do processo de fragmentação (DARDENGO; ROSSI; VARELLA, 2018).

Para obtenção de estimativas mais precisas quanto à diversidade e os cruzamentos ao longo das gerações, é necessário e importante realizar análises em mais eventos reprodutivos e em anos seguidos. De modo geral, o aumento na diversidade nos indivíduos regenerantes e de mudas oriundas de sementes traz consequências positivas, pois, estes vão compor as

futuras gerações da espécie. Contrariamente, a diminuição afeta negativamente as gerações, pois, pode ter perda de potencial evolutivo e depressão por endogamia (WRIGHT, 1931).

Em relação à distribuição da diversidade genética, em ambas as áreas avaliadas, foi observada maior diversidade genética dentro das coortes de indivíduos de *I. paraguariensis* do que entre as coortes, seguindo o padrão esperado para espécies alógamas. As divergências genéticas entre as coortes em ambas as áreas foram baixas, no entanto, foram significativas. Na área da FLONA de Chapecó em média 1,9% da diversidade não é compartilhada pelas coortes de indivíduos. Na área do PNM Teixeira Soares em média 0,9% da diversidade não é compartilhada pelas coortes. Por se tratar de coortes de indivíduos dentro de uma mesma área, este resultado pode ser indicativo da presença de fluxo gênico, pois esta diferença pode ser causada pela entrada de novos alelos na população.

Analisando a área da FLONA de Chapecó, comparando as divergências genéticas par a par (F_{ST}) entre as coortes, pode-se notar a manutenção dos valores de F_{ST} entre a coorte de adultos e de regenerantes, quando comparado com os valores de F_{ST} entre a coorte de adultos e de sementes. Os valores observados para distância genética de Nei foi mantido da coorte de adultos para de sementes; porém, entre a coorte de regenerantes e de sementes houve aumento na divergência genética. Os indivíduos regenerantes são oriundos de vários eventos reprodutivos, e possui maior número de alelos exclusivos nesta área, o que provavelmente interferiu nos resultados encontrados. Já na área do PNM Teixeira Soares houve um aumento na divergência genética da coorte de adultos e de regenerantes em relação à coorte de adultos e de sementes, corroborando também com os valores de distância genética de Nei, que também aumentaram. Igualmente os valores de F_{ST} entre a coorte de regenerantes e de sementes também foi maior.

Ao realizar a análise das coortes entre áreas, foi observada divergência genética significativa entre as coortes. Sendo que houve a manutenção dos níveis de divergência entre as coortes de adultos para as coortes de sementes. Possivelmente o fluxo gênico é mantido entre essas populações, e não houve redução em relação ao passado. O número médio de migrantes entre áreas ao longo das gerações se manteve, sendo mais um indicativo da manutenção da diversidade. Estes fatos indicam o padrão da espécie e a capacidade de manutenção da diversidade genética e fluxo gênico entre populações. Divergências genéticas próximas aos valores encontrados no presente trabalho também foram obtidos pela a maioria dos estudos realizados com a *I. paraguariensis* (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; MATTOS, 2015; SEOANE et al., 2019; SILVA, 2019; STEDILLE, 2020; WENDT, 2005).

De modo geral, mesmo com a presença da fragmentação florestal, e algumas pequenas alterações ao longo das gerações nos valores dos índices de diversidade, a manutenção da variabilidade genética para a *I. paraguariensis*, pode ser considerada uma característica favorável para a espécie em um cenário atual com paisagem fragmentada. Como já mencionado, os plantios e os enriquecimentos realizados pelos agricultores ao longo da área de ocorrência da espécie, auxiliam na manutenção da diversidade. No entanto, ressalta-se a necessidade de continuação nos trabalhos com a espécie, com a avaliação e comparação de dois ou mais eventos reprodutivos, para ter maiores informações do fluxo gênico contemporâneo, para sua conservação.

5.7 CONCLUSÃO

As populações estudadas apresentam desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, e de modo geral um excesso de indivíduos homozigotos. Não houve diferença significativa para os índices de diversidade entre as populações e entre as coortes de indivíduos, e os valores de índice de fixação foram altos e significativos.

A divergência genética entre as coortes de adultos e de sementes foi menor que entre as coortes de regenerantes e sementes, tanto na área da FLONA de Chapecó quanto na área do PNM Teixeira Soares. A maior diferença entre a coorte de regenerantes e de sementes se deve provavelmente pela sobreposição de gerações, presente na coorte dos regenerantes.

Entre a FLONA de Chapecó e o PNM Teixeira Soares a divergência genética foi mantida das coortes de adultos para as coortes de sementes, indicando a presença de fluxo gênico contemporâneo entre as áreas.

De maneira geral com os resultados obtidos no presente estudo, comparando as coortes de adultos e de sementes, não houve redução considerável no fluxo gênico entre as populações de *I. paraguariensis* em relação ao passado. Recomenda-se que a continuidade dos estudos deve levar em consideração mais ciclos reprodutivos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização histórica da erva-mate e o elevado consumo da espécie, principalmente na região Sul do Brasil, caracterizam a elevada importância da espécie, e com isso é uma espécie de interesse para a realização de estudos que forneçam cada vez mais informações a cerca da espécie.

O presente trabalho é um avanço na ampliação de informações a respeito da diversidade genética de *Ilex paraguariensis*, principalmente pela quantidade de populações estudadas e a comparação entre diferentes coortes demográficas.

De maneira geral os resultados obtidos sugerem desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois, todas as populações estudadas apresentaram valores de heterozigosidade observada menor que a esperada, demonstrando um excesso de indivíduos homozigotos. Por se tratar de uma espécie alógama, este aumento pode ser resultado de endocruzamentos, ou seja, cruzamento entre indivíduos aparentados.

Não houve diferenças significativas para os índices de diversidade entre as populações, nem entre as coortes demográficas, no entanto, todas as populações apresentaram índice de fixação elevado e significativo. Embora, tenha esses valores elevados, em uma análise generalizada, dado o uso da espécie e ocorrência atual, pode se dizer que há manutenção da diversidade genética da espécie nas áreas estudadas ao longo das gerações. A presença observada de grande número de indivíduos regenerantes na maioria das áreas de estudo pode ser uma confirmação. Os alelos exclusivos encontrados nas coortes de regenerantes e sementes de maneira geral, também podem evidenciar a manutenção.

O fluxo gênico é facilitado com a ampliação na conexão de fragmentos, a presença de populações espontâneas e plantios comerciais nas proximidades das áreas, e, os enriquecimentos das áreas nos arredores com a espécie, realizado pelos agricultores, auxiliam na manutenção de uma cobertura florestal razoável, mesmo que fragmentada. As paisagens domesticadas para a produção de erva-mate não levam a redução na variabilidade genética, no entanto, deve se ter sempre cautela na realização de plantios homogêneos, para que não aumente a endogamia na espécie.

A distribuição da diversidade genética da espécie segue o padrão para espécies alógamas, sendo a maior variação dentro das populações do que entre. A distância geográfica entre as populações não tem relação direta com a divergência genética das populações de erva-mate, provavelmente pelo uso e histórico da espécie, no entanto, como os valores obtidos de divergência genética são significativos para todas as populações, é recomendada a

conservação de remanescentes maiores, aumentar a conectividade entre fragmentos. Essas recomendações contribuem com o aumento do fluxo gênico, para manutenção e conservação futura da variabilidade genética da espécie.

De modo geral, mesmo com a presença da fragmentação florestal, e algumas pequenas alterações ao longo das gerações nos valores dos índices de diversidade, a manutenção da variabilidade genética para a *I. paraguariensis*, pode ser considerada uma característica favorável para a espécie em um cenário atual com paisagem fragmentada. E isto, pode estar associado ao uso da espécie com suas populações espontâneas, principalmente na região sul do Brasil. Como já mencionado, os plantios e os enriquecimentos realizados pelos agricultores ao longo da área de ocorrência da espécie, auxiliam na manutenção da diversidade, pois, facilita o fluxo gênico e amplia a conexão entre os fragmentos.

Com isso, pode se dizer que há situações favoráveis para a conservação da diversidade da espécie na atual ocorrência, nas populações em estudo, pois apresentam grande potencial como fonte de diversidade para restauração, porém, para estratégias de conservação da espécie em estudo recomenda-se conservar fragmentos de tamanho maior, e se possível com ligações entre fragmentos, para manutenção da variabilidade genética intrapopulacional. Recomenda-se a continuação nos trabalhos com a espécie, com mais populações, e com avaliação e comparação de dois ou mais eventos reprodutivos, para ter maiores informações do fluxo gênico contemporâneo, para sua conservação.

REFERÊNCIAS

- 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, 2013.
- ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, 2014.
- 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**, v. 25, n. 3, 2002.
- BALAZINA, A. (Coord.) et al. **Relatório anual de atividades SOS Mata Atlântica**. Fundação SOS Mata Atlântica, 2017. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/sobre/relatorios-e-balancos/>.
- BALBINOT, R. et al. Análise fitossociológica de um fragmento de Floresta Estacional Decidual: Parque Estadual do Turvo, RS. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, PR, v. 36, n. 86, 2016.
- BACKES, A. Distribuição geográfica atual da Floresta com Araucária: condicionamento climático. In: FONSECA, C. R. et al. (Eds.). **Floresta com Araucária: Ecologia, conservação e desenvolvimento sustentável**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2009. 39-44 p.
- BACKES, P; IRGANG, B. **Árvores do sul: Guia de identificação e interesse ecológico – As principais espécies nativas do sul**. 1. ed., Pallotti Clube da árvore: Instituição Souza Cruz, 2002. 325 p.
- BERTOLDO, E.; PAISANI, J. C.; OLIVEIRA, P. E. Registro de Floresta Ombrófila Mista nas regiões sudoeste e sul do estado do Paraná, Brasil, durante o Pleistoceno/Holoceno. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, 2014.
- BERTONI, B. W. et al. Genetic diversity among natural populations of *Mandevilla velutina*. **Horticultura brasileira**, v. 28, n. 2, 2010.
- BISOGNIN, D.A. et al. Contents of total phenolics and flavonoids and antioxidant activity in leaves of *Ilex paraguariensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, 2019.
- BITTENCOURT, J.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v. 99, n. 6, 2007.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, 2011.
- BRASIL. Análise Integrada das Cadeias Produtivas de Espécies Nativas da FOM e seu impacto sobre este Ecossistema: diagnóstico das cadeias produtivas do pinhão e da erva-mate. v. 1, Relatório final. **Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza, CERTI: Fundação Centros de Referência em Tecnologias Inovadoras**, 2012.

BRASIL. **Plano Nacional de Fortalecimento das Comunidades Extrativistas e Ribeirinhas – PLANAFE: 2017-2019**. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Extrativismo e Desenvolvimento Rural Sustentável – Brasília, DF: MMA, 2017. 111 p.

BRASIL. Decreto n° 1.298, de 27 de Outubro de 1994. Aprova o Regulamento das Florestas Nacionais, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 31 out. 1994 e retificado dia 31 nov. 1994. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1990-1994/d1298.htm>. Acesso em: Abril/2020.

BRASIL. Decreto n° 5.746, de 05 de Abril de 2006. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 abr. 2006. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5746.htm>. Acesso em: Abril/2020.

BRASIL. Decreto n° 6.660, de 21 de Novembro de 2008. Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 nov. 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/decreto/d6660.htm>. Acesso em: Abril/2020.

BRASIL. Lei n° 9.985, de 18 de Julho de 2000. Institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 jul. 2000. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9985.htm>. Acesso em: Abril/2020.

BRASIL. Lei n° 11.428, de 22 de Dezembro de 2006. Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 dez. 2006 - retificado em 9 jan. 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Lei/L11428.htm>. Acesso em: Abril/2020.

BRASIL. Lei n° 12.651, de 25 de Maio de 2012. Código Florestal Brasileiro. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 mai. 2012. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12651.htm>. Acesso em: Abril/2020.

BRASIL. Portaria n° 560, de 25 de Outubro de 1968. Alteração de categoria: De Parques Florestais para Florestas Nacionais, dos municípios de Caçador, Chapecó e Três Barras em Santa Catarina. **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**, Rio de Janeiro, RJ, 25 out. 1968. Disponível em: <https://documentacao.socioambiental.org/ato_normativo/UC/2242_20160524_160242.pdf>. Acesso em: Abril/2020.

BRASIL. Portaria n° 026, FATMA, de 26 de Março de 2014. Reconhece como Reserva Particular do Patrimônio Natural Estadual COMPLEXO SERRA DA FAROFA, situada nos municípios de Bocaina do Sul, Paineira, Rio Rufino, Urupema e Urubici, e em Santa Catarina. **Diário Oficial [do] Estado de Santa Catarina**, 27 mar. 2014. Disponível em: <<http://intranet.fatma.sc.gov.br/web/portarias/2014>>. Acesso em: Abril/2020.

- BRUXEL, F. et al. Taxonomia, descrição e distribuição geográfica de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. In: FERLA, N. J.; SILVA, G. L.; JOHANN, L. (Orgs.). **A cultura da erva-mate e os ácaros: situação atual e perspectivas**. 1. ed., Porto Alegre: Evangraf, 2018. 168 p.
- CABRAL, A. et al. Aquifoliaceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 69, n. 2, 2018.
- 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. 336 p.
- CALLEN D.F. et al. Incidence and origin of “null alleles” in the (AC)_n microsatellite markers. **The American Journal of Human Genetics**, v.52, n. 5, 1993.
- CAMPANILLI, M.; SCHAFFER, W. B. (Org.). **Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros**. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Núcleo Mata Atlântica e Pampa, Brasília: MMA, 2019. 408 p.
- CANSIAN, R. L. et al. Genetic Conservation and Medicinal Properties of Mate (*Ilex paraguariensis* St Hil.). **Pharmacognosy Reviews**, v. 2, n. 4, 2008.
- CARGNIN, A. P. et al.. **Atlas Socioeconômico Rio Grande do Sul**. Departamento de planejamento Governamental, 4. ed., Porto Alegre: Secretaria de Planejamento, Orçamento e Gestão, 2019. Disponível em: <https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/mata-atlantica>.
- CARLUCCI, M. B. et al. Conservação da Floresta com Araucária no extremo sul do Brasil. **Natureza & Conservação**, v. 9, 2011.
- CARNEIRO, F. et al. Low inter-annual variation of mating system and gene flow of *Symphonia globulifera* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, Lawrence, v.39, p.628-636, 2007.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.
- CARVALHO, A. C. M. et al. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, 2010.
- CASCALES, J. et al. Genetic diversity of wild germplasm of “yerba mate” (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) from Uruguay. **Genética**, v. 142, n. 6, 2014.
- CHAVES, A. D. C. G. et al. A importância dos levantamentos florístico e fitossociológico para a conservação e preservação das florestas. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 9, n. 2, 2013.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v. 23, 1969. 72-84 p.

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

CONTE, R. et al. Genetic Structure and Mating System of *Euterpe edulis* Mart. Populations: A Comparative Analysis Using Microsatellite and Allozyme Markers. **Journal of Heredity**, v. 99, n. 5, 2008.

CORDEIRO, J. L. P.; HASENACK, H. Cobertura vegetal atual do Rio Grande do Sul. In: PILLAR, V. et al. (Eds.). **Campos Sulinos – conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: MMA, 2009. 403 p.

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, 2015.

COUTINHO, L. M. O conceito de Bioma. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 1, 2006.

COUTO, C.; MOURA, S. RPPNE Complexo Serra da Farofa. In: COUTINHO, R. (Org.). **Guia das RPPNs de Santa Catarina**. Ed: Expressão Ltda; Florianópolis, SC, 2018, 48 p.

CRUZ, A. P. et al. Inter-Relação entre paisagem, organização Florístico-Estrutural e demografia do componente arbóreo em Floresta com Araucárias. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 1, 2018.

CUNHA, G. G.; FERREIRA, A. G. Viabilidade das sementes de erva-mate. **Ciência e Cultura**, v. 39, n. 10, 1987.

CUQUEL, F. L.; CARVALHO, M. L. M.; CHAMMA, H. M. C. P. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, n. 3, 1994.

DA COSTA, R. B. et al. Avaliação genética de indivíduos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) na região de Caarapó, MS, pelo procedimento REML/BLUP. **Ciência Florestal**, v. 15, n. 4, 2005.

DARDENGO, J. F. E.; ROSSI, A. A. B.; VARELLA, T. L. The effects of fragmentation on the genetic structure of *Theobroma speciosum* (Malvaceae) populations in Mato Grosso, Brazil. **Revista Biología Tropical**, v. 66, n. 1, 2018.

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

DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, n. 93, 2004.

DEGEN B.; SEBBENN A. M. Genetics and Tropical Forests. In: KÖHL M.; PANCEL L. (eds.), **Tropical Forestry Handbook**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014.

DIAZ, V. S. **Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em dois fragmentos florestais na área do entorno do Parque Nacional do Iguaçu.** 2013. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área - conservação de Ecossistemas Florestais). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Programa de Recursos Florestais, Piracicaba, SP, 2013.

DICKEL, M. L.; RITTER, M. R.; BARROS, I. B. I. *Ilex paraguariensis*: Erva-mate. In: COORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul.** Brasília: MMA, 2011. 934 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, 1987.

DUTRA, L. F.; HANSEL, L. F.; WENDLING, I. **Introdução ao Cultivo *in vitro* de Erva-mate (*Ilex paraguariensis*).** 1. ed., Embrapa Florestas, Colombo, PR, 2008. 38 p.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, 1992.

EGUIARTE, L. E. et al. Direct and indirect estimates of neighborhood and effective population size in a tropical palm, *Astrocaryum mexicanum*. **Evolution**, v. 47, n. 1, 1993.

ELIAS, G. A.; PADILHA, P. T.; SANTOS, R. O Bioma Mata Atlântica. In: SANTOS, R. et al. (Orgs.). **Biodiversidade em Santa Catarina: Parque Estadual da Serra Furada.** Criciúma, SC: UNOESC, 2016. 188 p.

ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, v.72, 1994.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina – DF, Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

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, 1994.

FERREIRA, A. G. Erva-mate & chimarrão: seleção genética aprimora tradição secular. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 111, 1995.

FERREIRA, A. G. Estrutura e desenvolvimento da semente e embrião. In: Congresso Sul-Americano da erva-mate e Reunião técnica do Cone Sul sobre a cultura da erva-mate, Colombo, PR. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 1997. 133-139 p.

FERREIRA, A. G. et al. M. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Brasil Florestal**, Brasília, n. 53, 1983.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas.** 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. 220 p.

FLORA DO BRASIL. Aquifoliaceae. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB4904>. Acesso em: 12 jun. 2020

FONTANA, C.; GASPER, A. L.; SEVEGNANI, L. A raridade das espécies arbóreas de Lauraceae no planalto do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Hoehnea**, v. 43, n. 3, 2016.

FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.S. **Conservation and Evolution**. London: Cambridge University Press. 1981, 327 p.

FRANKLIN, I.R.; FRANKHAM, R. How large must populations be to retain evolutionary potential? **Animal Conservation**, v. 1, 1998.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica – período de 2018-2019**: Relatório Técnico. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, 2020. 61 p.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**, 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631 p.

GANEM, R. S. (Org.). **Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas**. Brasília: Câmara dos Deputados, Edições Câmara, 2010. 437 p.

GASCA-PINEDA, et al. Effective population size, genetic variation, and their relevance for conservation: the bighorn sheep in Tiburon island and comparisons with managed artiodactyls. **Plos One**, v. 8, n. 10, 2013.

GASPER, A. L. et al. Inventário florístico florestal de Santa Catarina: espécies da Floresta Ombrófila Mista. **Rodriguésia**, v. 64, n. 2, 2013a.

GASPER, A. L. et al. Flora vascular da Floresta Ombrófila Mista. In: VIBRANS, A. C. et al. (Ed.). **Floresta Ombrófila Mista**. Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina. v. 3, Blumenau: Edifurb. 2013b. 440 p.

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

GERHARDT, M. **História ambiental da Erva-mate**. 2013. 290p. Tese (Doutorado em História Cultural). Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em História, Florianópolis, SC, 2013.

GHAZOUL, J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. **Biological Review**, Oxford, v. 80, 2005.

GILBERTI, G.C. Aquifoliaceae. In: SPICHIGER, R.; RAMELLA, L. (Eds.). **Flora del Paraguay**, v. 24, Saint-Louis, Editions des la Ville de Genève, Chambèsy; Missouri Botanical Garden, 1994. 33 p.

GNOATTO, S. C. B. et al. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae). **Química nova**, v. 30, n. 2, 2007.

- GODOY, F. M. G. et al. High genetic diversity and moderate genetic structure in the self incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 187, n. 4, 2018.
- GOIS, I. B.; FERREIRA, R. A.; SILVA-MANN, R. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Cassia grandis* L. f. **Floresta e Ambiente**, v. 25, n. 4, 2018.
- GOUDET, J. FSTAT (Version 2.9.3.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, Newport, v. 86, 2002.
- GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução a genética**. [tradução: Sylvia Werdmüller von Elgg Roberto]. 11. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- GROPPO, M. Aquifoliaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em:
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4904>
- GUERRA, M. P. et al. Exploração, manejo e conservação da Araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Orgs.). **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais**. Editora SENAC: São Paulo, SP, Brasil, 2002. 85-101 p.
- GUIMARÃES, R. A. et al. Mating system and pollen dispersal in *Dipteryx alata* Vogel (Leguminosae): comparing *in situ* and *ex situ* conditions. **Tree Genetics & Genomes**, v. 15, n. 28, 2019.
- HAMILTON, M. B. **Population genetics**. Wiley-Blackwell, 2009.
- HAMRICK, J.L. ; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D. et al. (Eds.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, MA, 1989. 43-63 p.
- 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.
- HELLBERG, M. E. et al. Genetic assessment of connectivity among marine populations. **Bulletin of Marine Science**, v. 70, n. 1, 2002.
- HIGUCHI, P. et al. Influência de variáveis ambientais sobre o padrão estrutural e florístico do componente arbóreo, em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Montana em Lages, SC. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, 2012.
- HMELJEVSKI, K. V. et al. Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Macro caracterização dos Recursos Naturais do Brasil: Províncias estruturais, compartimentos de relevo, tipos de solos, regiões fitoecológicas e outras áreas**. IBGE, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. 179 p.

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Elsevier Science, TREE**, v. 11, n. 10, 1996.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF – ESALQ/USP**, v. 12, n. 32, 1998.

KAGEYAMA P. Y. et al. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v. 64, 2003.

KERSTEN, R. A.; BORGIO, M.; GALVÃO, F. Floresta Ombrófila Mista: aspectos fitogeográficos, ecológicos e métodos de estudo. In: EISENLOHR, P. V. et al. (Orgs.). **Fitossociologia no Brasil: métodos e estudos de caso**. v. 2, 1. ed., Editora UFV, 2015. 474 p.

KLAUBERG, C. et al. Florística e estrutura de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista no Planalto Catarinense. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 1, 2010.

KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do Pinheiro Brasileiro. **Sellowia**, v. 12, 1960.

KLEIN, R. M. Flora Ilustrada catarinense: **Mapa fitogeográfico do Estado de Santa Catarina**. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues, 1978.

KUBIAK, G. B. et al. Comparação da variabilidade genética entre plantas adultas e jovens de *Ilex paraguariensis* St. Hil. de uma área de Floresta urbana geneticamente isolada. **Perspectiva**, Erechim. v.34, n.125, 2010.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária**. 1983. 233 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, setor de Ciências Agrárias, 1983.

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, 2014.

LAUTERJUNG, M. B. et al. Phylogeography of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*): integrative evidence for pre-Columbian anthropogenic dispersal. **Tree Genetics & Genomes**, v. 14, n. 36, 2018.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). 2001. Disponível em: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.

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

LOISELLE, B. A.; SORK, V. L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 82, n. 11, 1995.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 1, 7. ed., São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da Flora, 2016.

LYNCH, M.; LANDE, R. The critically effective size for a genetically secure population. **Animal Conservation**, v. 1, 1998.

MACCARI JUNIOR, A.; SANTOS, A.P.R. O alimento erva-mate e a erva-mate em alimentos. In: MACCARI JUNIOR, A.; MAZUCHOWSKI, J.Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate do Paraná, 2000. 43-69 p.

MANTEL N.; VALAND R.S. A technique of nonparametric multivariate analysis. **Biometrics**. n. 26, 1970.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. C.; REIS, M. S. Internal Genetic Structure and Outcrossing Rate in a Natural Population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 5, 2006.

MARQUES, A. C.; REIS, M. S.; DENARDIN, V. F. As paisagens da erva-mate: uso das florestas e conservação socioambiental. **Ambiente & Sociedade**, São Paulo, v. 22, 2019.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.). **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1. ed., Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100 p.

MARTINS, E. M. et al. Development and characterization of microsatellite loci for *Ocotea* species (Lauraceae) threatened with extinction. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, 2014.

MARTINS-RAMOS, D. et al. Florística de Floresta Ombrófila Mista Altomontana e de Campos em Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira Biociências**, v. 9, n. 2, 2011.

MATTOS, A.G. **Conservação pelo uso de populações de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil, em sistemas extrativistas no planalto norte catarinense**. 2015. 289p. Tese (Doutorado em Ciências – Área: Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, SC, 2015.

- MEDRADO, M. J. S. **Trabalhador no cultivo de plantas industriais – Erva-mate:** produção. 1. ed., n. 1, Curitiba: SENAR – Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2003. 47 p.
- METZGER, J. P. et al. Time-lag in biological responses to landscape changes in a highly dynamic Atlantic forest region. **Biological Conservation**, Amsterdam, v. 142, n. 6, 2009.
- MEYER, L. et al. Fitossociologia do componente arbóreo/arbustivo da Floresta Ombrófila Mista em Santa Catarina. In: VIBRANS, A. C. et al. (Eds.). **Floresta Ombrófila Mista.** Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina. v. 3, Blumenau: Edifurb. 2013a. 440 p.
- MEYER, L. et al. Regeneração natural da Floresta Ombrófila Mista de Santa Catarina. In: VIBRANS, A. C. et al. (Eds.). **Floresta Ombrófila Mista.** Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina. v. 3, Blumenau: Edifurb. 2013b. 440 p.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Mata Atlântica.** Disponível em: https://www.mma.gov.br/biomas/mata-atl%C3%A2ntica_emdesenvolvimento. Acesso em: Abril de 2020.
- MITTERMEIER, R. A. et al. **Hotspots revisited.** Cidade do México: CEMEX, 2004.
- 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, 2012.
- MONTAGNA, T. et al. Spatial genetic structure, population dynamics, and spatial patterns in the distribution of *Ocotea catharinensis* from southern Brazil: implications for conservation. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 48, 2018.
- MORAES, R. C. S. et al. Microsatellite markers for an endemic Atlantic Forest tree, *Manilkara multifida* (Sapotaceae). **AoB PLANTS**, v. 5, 2013.
- MORAES, P.L.R. DE; DERBYSHIRE, M.T.V. DE C... Genetic structure of natural populations of *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae) through isozyme markers. **Biota Neotropica**. v. 22, n. 2, 2002.
- MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, 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, 2005.
- MOURA, T. M. et al. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. **Scientia Forestalis**, Piracicaba - SP, v. 37, n. 82, 2009.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspot for conservation priorities. **Nature**, v. 40, 2000.
- 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 Amazônica**, v. 36, n. 2, 2006.

NAZARENO, A. G.; ZUCCHI, M. I.; REIS, M. S. Microsatellite markers for *Butia eriospatha* (Arecaceae), a vulnerable palm species from the Atlantic Rainforest of Brazil. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 7, 2011.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided population. **Annals of Human Genetics**, v. 41, 1977. 225-233 p.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, n. 89, 1978.

NEGRINI, M. et al. Heterogeneidade florístico-estrutural do componente arbóreo em um sistema de fragmentos florestais no Planalto Sul Catarinense. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 38, n. 5, 2014.

OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: Seminário sobre Atualidades e Perspectivas Florestais: Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1983, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. 17-36 p.

OOSTERHOUT, C.V. et al. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, n. 4, 2004.

PAULA, M.L. de; CHOCIAI, J.G. Uso e aplicação industrial da erva-mate em cosméticos. In: MACCARI JUNIOR, A.; MAZUCHOWSKI, J.Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate do Paraná, 2000. 77-91 p.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E.; HUFF, D. R. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss (*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.). **Molecular Ecology**, n. 4, p. 135–147, 1995.

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**. n. 6, 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics** In press., 2012.

PEREIRA, M. F. et al. Shotgun sequencing for microsatellite identification in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Applications in Plant Sciences**, v. 1, n. 3, 2013.

PIRES, D. A. C. K. et al. A erva-mate no Planalto Norte Catarinense: os compostos bioativos como variável na determinação das especificidades necessárias ao reconhecimento como indicação geográfica. **DRd – Desenvolvimento Regional em debate**, v. 6, n. 2, 2016.

PIRES, E. Z. et al. Biologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 13, n. 2, 2014.

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

PLANO de manejo do Parque Natural Municipal Mata do Rio Uruguai Teixeira Soares (município de Marcelino Ramos, RS). Socioambiental Consultores Associados Ltda.: Consórcio Itá, Florianópolis, SC, 2012. Disponível em: <<http://www.parqueteixeirasoaes.eco.br/planodemanejo>>.

PLANO de manejo da Floresta Nacional de Chapecó. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). v. 1 – Diagnóstico, Florianópolis, 2013. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-planos-de-manejo/flona_chapeco_pm_vol1.pdf>.

PLANO de manejo da Floresta Nacional de Três Barras. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). v. 1 – Diagnóstico, Brasília, 2016. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/plano-de-manejo/dcom_plano_de_manejo_Flona_Tres_Barras_vol_I.pdf>.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação.** Ed. Planta, Londrina, PR, 2001. 328p.

QUINET, A. et al. Aquifoliaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.). **Livro Vermelho da Flora do Brasil.** 1 ed., Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100 p.

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

REIS, M. S. et al. Distribuição da diversidade genética e Conservação de espécies arbóreas em remanescentes florestais em Santa Catarina. In: VIBRANS, A. C. et al. (Eds.). **Diversidade e Conservação dos remanescentes florestais.** Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina. v. 1, Blumenau, Edifurb, 2012. 344 p.

REIS, M. S. et al. Domesticated Landscapes in Araucaria Forests, Southern Brazil: A Multispecies Local Conservation-by-Use System. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 7, p. 11, 2018.

RIGO, L. et al. **Análise do mercado da erva-mate no Brasil e no Rio Grande do Sul,** 2014. Disponível em: <https://www.fee.rs.gov.br/wp-content/uploads/2014/05/201405267eeg-mesa22-analisemercadooervamatebrasilrs.pdf>.

RIO GRANDE DO SUL. Lei Municipal nº 028, de 5 de Junho de 2008. Cria o Parque Natural Municipal “Mata do Rio Uruguai Teixeira Soares”. **Prefeitura Municipal de Marcelino Ramos,** Marcelino Ramos, RS, 03 jul. 2008. Disponível em: <<https://www.marcelinoramos.rs.gov.br/restrito/upload/editais/415.pdf>>. Acesso em: Abril/2020.

ROSSI, E.; SARTORETTO, L. M. Caracterização de três espécies florestais de importância econômica. **Unoesc & Ciência – ACET,** Joaçaba, v. 5, n. 2, 2014.

SAIKI, F. A. et al. Development and validation of the first SSR markers for *Mimosa scabrella* Benth.. **Genetics and Molecular Research,** v. 16, n. 1, 2017.

SALAMI, B. et al. Dinâmica de populações de espécies arbóreas em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Montana em Lages, Santa Catarina. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 1, 2017.

SAMPAIO, J. et al. Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, RS, v. 10, n. 4, 2012.

SANT'ANNA, C.S. et al. Realized pollen and seed dispersal within a continuous population of the dioecious coniferous Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze). **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 14, n. 3, 2013.

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

SATO, T. et al. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. **Heredity**, v. 96, 2006.

SCHINELLA, G. R. et al. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, 2000.

SEBBENN, A. M. et al. Low level of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**. v. 106, n. 1, 2011.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE (SEMA). **Mata Atlântica Sul: Projeto de Conservação da Mata Atlântica no Rio Grande do Sul, PCMARS/ 2004-2009**. Rio Grande do Sul – Secretaria do Meio Ambiente. Porto Alegre: SEMA, 2009. 66 p.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em duas populações naturais de *Euterpe edulis* M. sob diferentes condições de fragmentação florestal. **Scientia Forestalis**, n. 69, 2005.

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

SEOANE, C. *et al.* The Neotropical tree *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae): pollen and seed dispersal in a fragmented landscape. **Annals of Forest Research**, v. 62, n. 2, 2019.

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.

SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO (SFB). **Inventário Florestal Nacional: principais resultados: Rio Grande do Sul**. Brasília, DF: MMA, 2018. 83 p. (Série Relatórios Técnicos - IFN). Disponível em: <http://www.florestal.gov.br/publicacoes>.

SEVEGNANI, L. et al. Estádios sucessionais da Floresta Ombrófila Mista de Santa Catarina. In: VIBRANS, A. C. et al. (Eds.). **Floresta Ombrófila Mista**. Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina. v. 3, Blumenau: Edifurb. 2013. 440 p.

SHAFFER, M. L. Minimum population sizes for species conservation. **BioScience**, Oxford, v. 31, n. 2, 1981.

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, 2000.

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, 2012.

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: BRENA, D. A.; BAGATINI, J. A. (Eds.). XIII Congresso Florestal Estadual do Rio Grande do Sul. **Anais...** v. 2, Nova Prata: Prefeitura Municipal; Câmara Municipal de Vereadores; Câmara da Indústria e Comércio, 2018. Disponível em: <http://www.congressoflorestalrs.com.br/files/anais/5ed55959686a5.pdf>

SILVA, D. T. **Diversidade e Estrutura Genética de populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil**. 2019. 97p. 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.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, 1985.

SLATKIN, M. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. **Science**, Washington D. C., v. 236, 1987.

SLATKIN, M.; BARTON, N.H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, v. 43, 1989.

SONEGO, R. C.; BACKES, A.; SOUZA, A. F. Descrição da estrutura de uma Floresta Ombrófila Mista, RS, Brasil, utilizando estimadores não-paramétricos de riqueza e rarefação de amostras. **Acta botânica brasileira**, v. 21, n. 4, 2007.

SOUSA, V. A.; AGUIAR, A. V.; SPOLADORE, J. Metodologia para a polinização controlada em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 39, n. 2, 2015.

SOUZA, I. R.; TONI, D. C.; CORDEIRO, J. **Genética evolutiva**. Florianópolis: Biologia/EAD/UFSC, 2011. 231p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG IV**. 4. ed., Nova Odessa, SP: Jardim Botânico Plantarum, 2019.

- STEDILLE, L. I. B. **Genética e ecologia de erva-mate na Floresta Ombrófila Mista: fundamentos para o manejo**. 2020. 175 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal – Área: Melhoramento e Recursos Genéticos). Universidade do Estado de Santa Catarina - Centro de Ciências Agroveterinárias. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2020.
- 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**, v. 9, 2007.
- STEFFEN, W. et al. The Anthropocene: conceptual and historical perspectives. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London a Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, London, v. 369, n. 1938, 2011.
- STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. de. **Melhoramento genético da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 274 p.
- VALDUGA, A. T. et al. Phytochemical profile of morphologically selected yerba-mate progênies. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 1, 2016.
- VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. **IPEF**, v. 35, 1987.
- VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Série técnica IPEF – ESALQ/USP**, v. 12, n. 32, 1998.
- VIBRANS, A. C. et al. (Ed.). **Diversidade e conservação dos remanescentes florestais**. Blumenau: Edifurb, v. 1, Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina, 2012. 344 p.
- VIBRANS, A. C. et al. (Ed.). **Floresta Ombrófila Mista**. Blumenau: Edifurb, v. 3, Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina, 2013. 344 p.
- VIEGAS, M. P. et al. Diversidade genética e tamanho efetivo de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob conservação *ex situ*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 4, 2011.
- VIEIRA, L. N. et al. An improved protocol for intact chloroplasts and cpDNA isolation in Conifers. **Plos One**, v. 9, n. 1, 2014.
- WACHOWICZ, R. C. **História do Paraná**. Curitiba: Editar. 1972. 188 p.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, n. 38, 1984.
- WENDLING, I.; SANTIN, D. (Eds.). **Propagação e nutrição de erva-mate**. 1. ed., Brasília, DF: Embrapa, 2014. 195 p.
- WENDT, S. N. **Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

WENDT, S. N. et al. Caracterização genética de procedências e progênies de *Ilex paraguariensis* St. Hil. utilizando marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, n. 73, 2007.

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

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97, 1931.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, 1943.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, n. 4, 1951.

ZECHINI, A. A. et al. Genetic Conservation of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Through Traditional Land Use. **Economic Botany**, v. 72, n. 2, 2018.

ANEXO I

Protocolo de extração de DNA de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.
adaptado por Silva, Bittencourt e Mantovani (2018).

	PROCEDIMENTOS
1	Preparar tubos com 5 beads. Ligar o banho-maria a 60°C.
2	Separar o material e cortar bem (cerca de 2 cm ²) dentro dos tubos do Precellys (com auxílio do funil de papel com ponteira).
3	Preparar na capela o tampão de extração (CTAB 2%) + βmercaptoetanol em um becker avulso, ressuspender bem com uma ponteira. Adicionar 5µL de mercaptoetanol para cada 1 mL de CTAB. Calcular a quantidade com base no número de amostras, sendo 1 mL de solução por amostra + “sobra” (Ex. para 10 amostras → 11 mL de CTAB e 55 µL de βmercaptoetanol).
4	Colocar 1 mL por amostra dessa solução.
5	Fechar bem os tubos e macerar no programa work (8000 rpm, 3x, 20s pausa 10 s). Repetir o processo por 3 vezes.
6	Transferir para o isopor e levar ao banho-maria por 1 h, invertendo a cada 10 min. Preparar tubos para as próximas etapas enquanto isso, não esquecer de anotar a ordem das amostras.
7	Retirar do banho-maria e remover as beads com imã na capela.
8	Adicionar 500 µL de CIA 24:1 (usar becker). Às vezes adicionar CIA antes pode facilitar a retirada das beads.
9	Agitar por 5 min a 120 rpm no agitador.
10	Centrifugar no máximo a 11500 rpm por 7 min.
11	Retirar o sobrenadante (parte aquosa de cima) com pipeta e colocar em novo tubo de 2 mL. Jogar a tampinha do tubo Precellys em um Becker com água e detergente. Após descartar adequadamente o conteúdo do tubo, jogá-lo também em água e detergente.
12	Adicionar 200 µL de Acetato de Potássio (5 M) + 500 µL de CIA 24:1.
13	Agitar por 5 min a 120 rpm no agitador.
14	Deixar a -20°C por 20 min (enquanto isso pode lavar os tubos do Precellys).
15	Centrifugar a 12500 rpm por 5 min.
16	Retirar o sobrenadante e colocar em um tubo novo de 1,5 mL.
17	Adicionar 600 µL de CIA.
18	Agitar por 5 min a 120 rpm.
19	Centrifugar a 12500 rpm por 5 min.
20	Retirar o sobrenadante e colocar em novo tubo de 1,5 mL.
21	Adicionar 600 µL de CIA.
22	Agitar por 5 min a 120 rpm.
23	Centrifugar a 12500 rpm por 5 min.
24	Transferir o sobrenadante para o último tubo de 1,5 mL (contendo o nome de cada amostra).
25	Adicionar 1 volume de Isopropanol gelado (mesmo volume da amostra, aproximadamente 500 µL) se possível retirar somente o precipitado branco que fica separado do precipitado do DNA. Isso melhora a qualidade da extração.
26	Agitar por 5 min e deixar no -20°C por 1 hora (pode deixar overnight).
27	Centrifugar a 12500 rpm por 5 min.
28	Retirar o Isopropanol virando o tubo com cuidado e adicionar 500 µL de álcool 70% gelado.
29	Agitar por 5 min a 120 rpm.
30	Centrifugar a 12500 rpm por 5 min.
31	Retirar o álcool 70 % virando o tubo cuidadosamente, adicionar 500 µL de álcool 96% gelado.
32	Agitar por 5 min a 120 rpm.
33	Centrifugar a 12500 rpm por 5 min.
34	Retirar o álcool 96 % (virando o tubo cuidadosamente).
35	Deixar o tubo aberto em cima de papel toalha limpo, de cabeça para baixo por aproximadamente 1 hora até a secagem do pellet. (cuidar para não perder o pellet).
36	Adicionar 100 µL de TE + RNase, fechar os tubos e deixar de 30 a 40 min em banho Maria a seco a 36°C.
37	Deixar overnight em geladeira e depois guardar as amostras em freezer a -20°C enquanto isso quantificar as amostras.