



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA LUCAS CHAVES

**ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DE *Aspidosperma
polyneuron* MÜLL. ARG. (APOCYNACEAE) NO PARQUE
ESTADUAL MATA DOS GODOY**

CAMILA LUCAS CHAVES

ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DE *Aspidosperma polyneuron* MÜLL. ARG. (APOCYNACEAE) NO PARQUE ESTADUAL MATA DOS GODOY

Projeto de Doutorado apresentado a Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Magno Sebbenn

Londrina
2013

CHAVES, CAMILA LUCAS. **ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DE *Aspidosperma polyneuron* MÜLL. ARG. (APOCYNACEAE) NO PARQUE ESTADUAL MATA DOS GODOY.** Projeto de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Doutorado) da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O processo de fragmentação teve início com a ocupação e o desenvolvimento das atividades agrícolas. Na região Norte do Paraná a ocupação teve início em virtude do desenvolvimento da atividade cafeeira, em face da expansão das fronteiras agrícolas paulistas. Desde sua ocupação até os dias de hoje, as atividades agrícolas são predominantes no Estado. Conseqüentemente, as áreas de remanescentes florestais tornaram-se extremamente restritas, restando cerca de 2% da cobertura original. A espécie arbórea tropical *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg., conhecida vulgarmente como peroba-rosa, possui uma presença marcante, ocupando o dossel da Floresta Estacional Semidecidual da região. Atualmente é reconhecida como em extinção no Estado, encontrando-se a espécie praticamente em unidades de conservação e raros em alguns fragmentos. Contudo, nada se sabe sobre a diversidade genética, estrutura genética espacial, endogamia, sistema de reprodução e padrões de dispersão de pólen e sementes nas populações remanescentes de *A. polyneuron* nestes fragmentos florestais. Tais informações são fundamentais para a adoção de medidas para a conservação genética da espécie. Dentro deste contexto, este estudo tem como objetivo, a investigação do fluxo contemporâneo de pólen e sementes, a diversidade genética, a distribuição espacial intrapopulacional de genótipos, e a dinâmica da endogamia entre gerações em uma população natural de *A. polyneuron*, por meio de locos microssatélites. O estudo será conduzido no Parque Estadual Mata dos Godoy, localizado no município de Londrina, na região norte do Estado do Paraná. Para tanto, pretende-se mapear, amostrar e analisar para locos microssatélites todas as árvores adultas, em parcelas alocadas sistematicamente e subparcelas para amostragem dos regenerantes estabelecida no centro da parcela. O tamanho amostral final será de cerca de 600 plantas. Para as análises genéticas serão utilizados no mínimo oito locos microssatélites que serão isolados para a *A. polyneuron*, dois locos de mtDNA e dois locos de cpDNA. A análise de parentesco (maternidade e paternidade) das plantas regenerantes permitirá determinar a distância e os padrões de dispersão de pólen e sementes dentro da parcela, bem como a proporção de plantas em regeneração que foram originadas de fluxo gênico externo a parcela. A análise da distribuição espacial dos genótipos será realizada para árvores adultas e plantas regenerantes, com base no coeficiente de coancestria estimado entre pares de indivíduos dentro de diferentes classes de distância. A diversidade genética e o índice de fixação serão estimados para adultos e regenerantes, o que permitirá conhecer os impactos da fragmentação sobre as novas gerações da população. As informações aqui obtidas poderão subsidiar um programa de conservação da espécie, bem como oferecer bases para coleta de sementes a serem utilizadas na conservação *ex situ* e na recuperação ambiental do Estado.

Palavras-chaves: endogamia; arbóreas tropicais; fluxo contemporâneo de pólen e sementes; microssatélites; mtDNA; cpDNA; Floresta Estacional Semidecidual.

1 INTRODUÇÃO

A fragmentação de florestas é um fenômeno e um problema mundial, resultante do desenvolvimento econômico de países desenvolvidos e subdesenvolvidos. No Brasil, esteve presente em todas as etapas da ocupação territorial, desde as mais antigas, na Mata Atlântica nordestina, até as atuais nas áreas de cerrado do Centro-Oeste e nas florestas úmidas da Amazônia (VIANA; TABANEZ; MARTINEZ, 1992). No norte do Estado do Paraná, como no restante do país, o processo de fragmentação florestal teve início com a ocupação e o desenvolvimento das atividades agrícolas. Região de solos oriundos de rochas basálticas, o norte paranaense foi ocupado em virtude do desenvolvimento da atividade cafeeira, em face da expansão das fronteiras agrícolas paulistas (ANJOS, 1998; MEDRI et al., 2002).

Ainda na década de 70 houve uma intensificação da exploração dos habitats naturais devido à mecanização agrícola. Em 1995 já restavam somente cerca de 8,89% da cobertura florestal original, compostas por formações arbóreas primárias e secundárias em estágio avançado de regeneração. Estimando-se que cerca de 70% das 7000 espécies vegetais já tinham seus habitats depauperados. Incluindo-se agora formações secundárias em estágio médio e avançado de regeneração, há cerca de 20,24% de cobertura florestal, concentradas em grande parte no centro-sul e sudeste do estado e as regiões Norte e Nordeste contam com os menores níveis (VICENTE, VANZELA, TOREZAN, 2002).

Em Londrina restam cerca de 3,38% da cobertura florestal, com remanescentes compostos por 82% dos fragmentos em sua maioria entre 0,01 e 0,1 km² de extensão (TOREZAN, 2004). Conseqüentemente, as áreas de remanescentes florestais tornaram-se extremamente restritas, levando a um decréscimo da diversidade na região (ANJOS, 1998; MEDRI et al., 2002).

A redução e isolamento dos fragmentos florestais são duas das principais ameaças às populações naturais de espécies arbóreas tropicais, bem como a de outras espécies que dependem das florestas. Em termos gerais, a fragmentação tem três principais efeitos sobre as populações de espécies arbóreas: *i)* redução no número total de indivíduos; *ii)* redução no tamanho médio das populações, quando indivíduos são restritos a pequenos fragmentos florestais e; *iii)* isolamento espacial das populações remanescentes, em uma paisagem intercalando fragmentos e

diferentes usos das terras (YOUNG; BOYLE, 2000a). Esses efeitos demográficos podem levar a redução ou interrupção do fluxo gênico via pólen e sementes entre as populações, alterando o tamanho efetivo populacional (HAMILTON, 1999; SEOANE; SEBBENN; KAGEYAMA, 2001) e conseqüentemente ocasionando a perda alelos, redução da heterozigosidade, aumento da divergência genética entre populações por deriva genética e aumento da endogamia e coancestria (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2004; YOUNG; BOYLE, 2000b).

Populações com tamanho efetivo muito baixo podem ter um rápido declínio, sendo localmente extinta. Entretanto, a longevidade de árvores, combinada com sementes viáveis e imigração de pólen, pode aumentar a resistência aos efeitos negativos da fragmentação florestal (HAMRICK, 2004; JUMP; PENUELAS, 2006). Assim, os elementos fundamentais para avaliar os impactos da fragmentação florestal sobre a diversidade genética das populações remanescentes são o nível de fluxo de genes (via pólen e semente) contemporâneo entre populações (HAMILTON, 1999; HAMRICK, 2004) e a caracterização da distribuição genética espacial dentro de vizinhanças reprodutivas.

Em populações naturais, o fluxo gênico intenso pode efetivamente contrapor os efeitos detrimenais da deriva genética e trazer novos alelos para as populações (BURCZYK; LEWANDOWSKI; CHALUPKA, 2004). As árvores em geral são organismos de vida longa e muito indivíduos remanescentes nos fragmentos podem ser oriundos de tempos pré-fragmentação, assim pode se esperar a detecção de um menor efeito da fragmentação nas árvores adultas e efeitos mais pronunciados nas gerações pós-fragmentação, como nas plantas regenerantes e em sementes coletadas de polinização livre (AGUILAR et al., 2008; GAINO et al., 2010; SEBBENN et al., 2011).

A espécie *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg., conhecida vulgarmente como peroba-rosa, era abundante e caracterizava fisionomicamente a Floresta Estacional Semidecidual no Estado do Paraná, dominando de forma evidente de 60 a 80% da cobertura do estrato emergente. Sua madeira tem grande valor econômico e foi fortemente explorada pela indústria de construção civil, com uso quase irrestrito na carpintaria (KLEIN, 1985).

A fragmentação florestal pode modificar a história evolutiva de populações naturais, alterar a dinâmica dos ecossistemas e comprometer a sobrevivência de diferentes espécies arbóreas á longo prazo. Tornando-se desafiador a realização de

planos de conservação e manejo de florestas fragmentadas, que auxiliem na recuperação e manutenção dos escassos fragmentos de vegetação natural do Estado. Diante deste contexto, informações sobre a diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico via pólen e sementes são fundamentais para o delineamento de estratégias apropriadas de conservação de *A. polyneuron*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPOSIÇÃO DA FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECIDUAL

A Mata Atlântica apresenta uma variedade de formações, englobando um conjunto diversificado de ecossistemas florestais com estruturas e composições florísticas bastantes diferenciadas, acompanhando as características climáticas e geográficas (IBGE, 1992).

A Floresta Estacional Semidecidual (FES) ou Floresta Tropical Subcaducifolia (VELOSO; RANGEL-FILHO; LIMA, 1991), também denominada por RIZZINI (1963) de Floresta Estacional Mesófila Semidecídua, ou ainda Floresta Latifoliada Tropical por AZEVEDO (1959), é uma fitofisionomia intrínseca ao bioma Floresta Atlântica, constituindo uma formação transicional entre as florestas de encosta litorâneas e as formações não florestais de interior.

Essa formação florestal está condicionada pela dupla estacionalidade climática. Uma estação tropical com épocas de intensas chuvas de verão, seguida por estiagem acentuada e uma segunda estação subtropical sem período seco, mas com seca fisiológica provocada pelo frio do inverno e temperaturas médias de 15°C (IBGE, 1992). É caracterizada ainda pela ausência de coníferas e presença de indivíduos arbóreos que perdem as folhas (caducifolios) durante o inverno ou estação seca. A porcentagem de indivíduos caducifolios varia de 20 a 50% do conjunto florestal e não das espécies caducifolias. Nas áreas tropicais são compostas por mesofanerófitos que revestem os solos areníticos distróficos e nas áreas subtropicais por macrofanerófitos que revestem os solos basálticos, se apresentando muitas vezes como uma mata densa, com árvores entre 25 e 30 m de altura (IBGE, 1992).

A Floresta Latifoliada Tropical é mais homogênea quando comparada com as

florestas Ombrófilas, no entanto, é uma das mais ricas do País, em volume de madeira, por unidade de área. Os solos derivados do basalto compreendem um grupo vegetal caracterizado principalmente por figueira-branca (*Ficus insipida*), rabo-de-mico (*Lonchocarpus muehlbergianus*), angico-vermelho (*Paraptadenia rigida*), aguai (*Crysophyllum gonocarpum*), canelão (*Ocotea cf. acutifolia*), sobrasil (*Colubrina glandulosa*), canela-de-veado (*Helietta apiculata*) e jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) no estrato superior. No estrato médio são frequentes as espécies: canela-preta (*Nectandra megapotamica*), guajuvira (*Patagonula americana*), cangerana (*Cabralea canjerana*), cedro (*Cedrela fissilis*) e o palmitreiro (*Euterpe edulis*) e no estrato inferior são comuns as espécies cincho (*Sorocea bonplandii*), laranjeira-do-mato (*Gymnanthes concolor*), jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius*), pau-de-junta (*Piper gaudichaudianum*) e catiguá (*Trichilia elegans*) (LEITE; KLEIN, 1990).

Áreas de vegetação secundária apresentam com grande frequência as espécies: fumo-brabo (*Solanum mauritianum*), grandíuva (*Trema micrantha*), pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*), urtigão-manso (*Boehmeria caudata*), embaúba (*Cecropia sp.*), algodoeiro (*Bastardiopsis densiflora*), capixingui (*Croton floribundus*) e Canela-guaicá (*Ocotea puberula*) (LEITE; KLEIN, 1990)

As florestas situadas em solos provenientes do Arenito Caiuá, do Oeste e do Nordeste do Paraná e Sudeste do Mato Grosso do Sul, eram visivelmente dominados pela espécie *A. polyneuron* perfazendo cerca de 30 a 60% da cobertura do estrato emergente (LEITE et al., 1986), assim como nas florestas situadas em terra roxa estruturada do norte do Paraná, onde dominava de forma evidente, constituindo cerca de 60 a 80% da cobertura do estrato emergente (KLEIN, 1985).

Aspidosperma polyneuron ocorre na formação montana e submontana da Floresta Estacional Semidecidual, (VELOSO; RANGEL-FILHO; LIMA, 1991), sendo encontrada também na Floresta Estacional Decidual, Floresta Ombrófila Densa, na Floresta Amazônica do extremo noroeste de Mato Grosso (CHIMELO et al., 1976), em menor escala na Floresta Ombrófila Mista no sul do Paraná, onde é rara (GALVÃO; KUNIYOSHI; RODERJAN, 1989), esporadicamente no domínio da Caatinga, em Minas Gerais (BRANDÃO; GAVILANES, 1994), no Pantanal Mato-Grossense e nas matas de tabuleiro (NASCIMENTO; SILVA; ARAGÃO, 1996).

Na América do Sul apresenta uma ampla distribuição geográfica (10° N na Venezuela a 25°50' S no Brasil), com ocorrência na Argentina, Colômbia, Paraguai, Peru e Venezuela. No Brasil, a espécie distribui-se naturalmente pelos Estados da

Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo (CARVALHO, 2004). É uma arbórea perenifólia, esciófita, bianual, secundária tardia ou clímax tolerante à sombra, alcançando de 15 a 25 m de altura e 50 a 100 cm de diâmetro a altura do peito (DAP), podendo atingir até 50 m de altura e 390 cm de DAP na idade adulta, sendo uma espécie longeva pode ultrapassar 1200 anos (CARVALHO, 2004). No estrato superior se distribuí de forma aleatória, já nos estratos inferiores ocorre de forma agregada (DURIGAN et al., 1995).

A espécie apresenta um tronco cilíndrico, reto ou levemente tortuoso. Sua casca externa é cinzenta a castanho-grisácea, áspera, profundamente fissurada longitudinalmente, já casca interna apresenta uma coloração rósea. As folhas são simples, alternas, variáveis quanto à forma, oblongas a obovado-elípticas, algumas vezes lustrosas na face superior, com ápice arredondado e margem inteira, com até 8 cm de comprimento e 3 cm de largura; firmemente membranáceas ou subcoriáceas e nervuras secundárias paralelas (CARVALHO, 2004).

No Paraná sua floração ocorre de novembro a dezembro, com flores hermafroditas, tubulares de coloração creme, numerosas e pequenas em panículas curtas e provável polinizadas por mariposas (MORELLATO, 1991), já a frutificação ocorre de julho a outubro, com frutos deiscentes, elipsóides, sésseis, geralmente achatados, com 2,5 a 6 cm de comprimento, apresentando uma crista mais ou menos proeminente e de coloração pardo-escura, com 2 a 5 sementes por fruto (CARVALHO, 2004).

Os indivíduos de *A. polyneuron* são considerados como os de maior valor econômico entre as espécies de *Aspidosperma* (CARVALHO, 1994). Isso se deve principalmente a qualidade de sua madeira moderadamente pesada (densidade 0,79 g/cm³), dura, compacta, com superfície opaca e áspera, de uso quase irrestrito em carpintaria (CARVALHO, 1994; LORENZI, 1998). Embora apresente uma baixa resistência ao ataque de organismos xilófagos, a madeira de peroba-rosa é resistente a cupins (CAVALCANTE et al., 1982). É utilizada na construção civil, como caibros, vigas, batentes de portas, rodapés, molduras, esquadrias, tacos para assoalhos, degraus de escadarias, e para confecção de móveis pesados. A árvore é ornamental podendo ser usada no paisagismo em geral. Sendo recomendada nos reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1998). Atualmente *A. polyneuron* se encontra

em extinção no norte do Paraná (SOUZA; MOSCHETA, 1987) e Mato Grosso, onde se enquadra na categoria de espécie vulnerável (FACHIM; GUARIM, 1995), necessitando, com urgência, de programa de conservação genética *ex-situ* e *in situ* (SIQUEIRA; NOGUEIRA, 1992).

2.3 ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL

As arbóreas tropicais são particularmente vulneráveis aos efeitos da degradação de habitat devido as suas características demográficas e reprodutivas, tais como, baixa densidade, sistema de cruzamento, autoincompatibilidade, altas taxas de fecundação cruzada e interação com polinizadores e dispersores de sementes (CASCANTE et al, 2002; DICK et al, 2003; WARD et al, 2005).

A fragmentação e isolamento das populações tendem a desenvolver forte estruturação genética espacial intrapopulacional, que é a distribuição não aleatória de genótipos entre e dentro de populações (VEKEMANS; HARDY, 2004), causada pela limitação na dispersão de pólen e sementes (DOLIGEZ; BARIL; JOLY, 1998; EPPERSON, 2004; VEKEMANS; HARDY, 2004), proporcionando o aumento de cruzamentos entre indivíduos parentais. A estrutura genética espacial (SGS) pode se formar em menos de dez gerações (EPPERSON, 1990). No entanto processos dinâmicos podem mudar os níveis de estruturação segundo a idade da população, fenômenos tais como a dispersão independente, seleção, auto desbaste e sucessão podem atuar sobre as populações (CHUNG et al, 1998).

A dispersão ou fluxo gênico é um fator muito importante quando se fala de estruturação de populações, podendo promover a homogeneização da diversidade genética, restringindo os efeitos da deriva genética e seleção e introduzir novas combinações alélicas nas populações (MARTINS, 2005; GARANT; FORDE; HENDRY, 2007).

O fluxo gênico apresenta uma grande variação entre espécies, populações e estações (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996), e o impacto deste, depende do nível de diversidade genética, organização espacial dos recursos e nível de redução populacional (COUVET, 2002).

A fragmentação além de reduzir o tamanho populacional diminui a mobilidade de dispersão ao redor dos fragmentos na matriz antropogênica (SMITH-RAMÍREZ et al., 2007), influenciando na visitação de polinizadores e reduzindo a quantidade de

frutos produzidos em comparação com ambientes não fragmentados (AIZEN; FEINSIGER, 1994).

Segundo BAWA; PERRY; BEACH (1985) as arbóreas tropicais são em sua grande maioria polinizadas por animais e aquelas espécies que apresentam polinizadores especializados tendem a um maior risco de falhas no sucesso reprodutivo, por redução do número de polinizadores e de árvores que sustentam as populações de polinizadores. Já espécies com polinização generalista apresentam falhas no sucesso reprodutivo quando há redução da fauna em geral (BOSHIER; BILLINGHAM, 2000).

Plantas isoladas, mas que há a presença de polinizadores tendem a apresentar um aumento na distância de dispersão de pólen. No entanto este aumento de dispersão está atrelado a dominância de poucos doadores de pólen, podendo levar a futuros gargalos genéticos (HANSON et al., 2008). Plantas perenes frequentemente não florescem todos os anos podendo gerar substancial variação interanual na quantidade e qualidade genética de pólen recebido pelas plantas em particular (IRWIN et al., 2003).

Populações com altas densidades de indivíduos acompanhadas por baixa diversidade de espécies tendem a uma baixa estruturação genética, pois o fluxo de pólen e sementes parece ser amplo suficiente para conter a formação de um pronunciado padrão de isolamento por distância. No entanto em populações com baixa densidade de indivíduos provavelmente o movimento de polinizadores entre indivíduos pode ser menos efetiva com pronunciado SGS. A diversidade parece apresentar uma correlação com a SGS, no sentido de co-florescimento de indivíduos na comunidade e aumento da competição por serviços de polinizadores entre as espécies, causando efeito no fluxo entre espécies, através de mudanças no número e qualidade de visitas (ZENG et al., 2011).

Na dispersão de sementes a barocoria tende a formar uma maior estruturação genética espacial do que dispersões zoocóricas, no entanto o forrageamento de animais dispersores em poucas plantas e a deposição agregada de sementes pode levar a SGS, esta também pode aumentar pela colonização de poucos genitores em uma área (HAMRICK; NASON, 1996; HARDY et al., 2006).

A dispersão tem forte influência nos padrões de distribuição espacial das populações e este pode por sua vez influenciar a SGS, plantas agregadas tendem a ter cruzamentos correlacionados e endogâmicos, levando a deriva genética e

aumento da SGS (EPPERSON, 2003). No entanto, isso não é uma regra para populações de padrões agregado, assim como padrões aleatórios também podem apresentar SGS. Processos que geram SGS são contrabalanceados pela heterogeneidade ambiental e seleção que alteram as frequências alélicas e genotípicas (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

2.4 MARCADORES DE MICROSSATÉLITES

Os microssatélites são pequenas sequências de nucleotídeos de 2 a 6pb, que ocorrem em forma de unidades repetitivas de mono, di, tri e tetra nucleotídeos ou mais. Os dinucleotídeos são as repetições mais frequentes, seguido por mono e tetra e os trinucleotídeos e demais repetições aparecem com menor frequência (ELLEGREN, 2004).

Regiões de microssatélites estão dispersas pelo genoma da grande maioria dos organismos, sendo classificados como marcadores neutros, devido às sequências de repetições estarem localizadas geralmente em regiões não codificadoras e sofrerem mutações sem os efeitos da seleção (ELLEGREN, 2004). Entretanto, há evidências de microssatélites em regiões codificantes, como também locos posicionados próximos a DNA não repetitivo codificante (OLIVEIRA et al., 2006).

A utilização de marcadores microssatélites em estudos populacionais de espécies florestais tem demonstrado tratar-se de uma ferramenta de alto potencial, sendo com frequência escolhidos para estudos de diversidade genética, sistema de reprodução, estrutura genética populacional e fluxo gênico de plantas. Esta preferência deve-se às muitas características dos SSRs tais como, a pequena quantidade de DNA necessária por amostra, à facilidade de detecção por PCR, a facilidade de análise, a herança codominante, o multi-alelismo, assim como a alta informatividade e abundância no genoma (POWELL et al., 1996; GUPTA; VARSHNEY, 2000).

A importância dos microssatélites para estudos genéticos tem sido demonstrada desde o início de 1994 (SAGHAI et al., 1994; BECKER; HEUN, 1995; LIU et al., 1996; STRUSS; PLIESKE, 1998). Posteriormente, mapas enriquecidos em microssatélites passaram a ser construídos para muitas espécies (RAMSAY et al., 2000; LI et al., 2003). Na maioria dos estudos os marcadores SSRs foram

desenvolvidos após o *screening* de pequenos insertos obtidos de bibliotecas enriquecidas com motivos de microssatélites.

Em espécies de interesse econômico, o uso de SSRs é facilitado devido à disponibilidade de grande volume de dados (expressed sequence tag ou EST) e ao desenvolvimento de várias ferramentas de bioinformática, que torna possível identificar e desenvolver SSRs a partir dos ESTs (PILLEN et al., 2000; THIEL et al., 2003; RAMSAY et al., 2004; VARSHNEY et al., 2006). Marcadores microssatélites não foram ainda aplicados para estudos de populações em peroba.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

O estudo será conduzido no Parque Estadual Mata dos Godoy localizado no município de Londrina, na região norte do Estado do Paraná. O Parque foi oficialmente criado pelo Decreto Estadual nº 5.150, de 5 de junho de 1989, com uma área de 675,70 ha. Em 30 de dezembro de 1997 foram acrescidos mais 14,4756 ha, pelo Decreto Estadual nº 3.917, totalizando 690,1756ha, dos quais, aproximadamente 675 ha são cobertos por vegetação florestal (VICENTE, 2006). Administrado pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP), o centro da unidade de conservação está localizado entre as coordenadas 23° 27' S e 51° 15' W. O clima da região, de acordo, com a classificação de Köppen é mesotérmico, sem estação seca, com verões quentes, sendo a média do mês mais quente superior a 22° C, com a presença frequente de geadas (Cfa). A precipitação média varia de 1.400 a 1.600 mm distribuídos de forma irregular durante todo o ano (IAPAR, 2000). O solo da região é de alta fertilidade, caracterizado como Latossolo Roxo Eutrófico, Nitossolo Vermelho Eutroférico (terra roxa estruturada) e associações com solo Litólico (VICENTE, 2006). A vegetação do Parque Estadual Mata dos Godoy é classificada como Floresta Estacional Semidecídua submontana e representa um dos últimos remanescentes de Floresta subtropical, que no passado recobria grande parte do Estado do Paraná e se estendia até o Paraguai e Argentina.

3.3 Estratégias de amostragem

Para amostragem será realizado um censo de todas as árvores adultas (aquelas que atravessam o dossel) do Parque Mata dos Godoy. Serão avaliadas todas as árvores, medidas quanto ao DAP (diâmetro a altura do peito) e altura, georreferenciadas com auxílio de GPS e retirada amostras de câmbio para as análises genéticas. Para coleta do câmbio serão realizadas pequenas incisões na casca, até atingir a região do câmbio (na altura do DAP), onde serão coletadas amostras do lenho por meio de trado de incremento, com apenas três centímetros. No local de retirada da amostra, no caule, será aplicado fungicida e o ferimento será vedado com massa de vidraceiro. As amostras coletadas serão coletas em tampão CTAB 2% e devidamente identificadas para posterior preparo e análise em laboratório.

Para estudar o fluxo de pólen e sementes, e conhecer a dinâmica da endogamia entre as gerações adultas, jovens e regenerantes, serão alocadas parcelas sistematicamente pela área de distribuição dos indivíduos adultos, com intuito de levantar informações sobre a maternidade e paternidade dos regenerantes e os padrões de fluxo de pólen e sementes dentro da área. Para tal serão coletados tecidos foliares de pelo menos 150 jovens e 150 plantas regenerantes dentro das parcelas e mensuradas quanto às suas respectivas alturas. Para as análises genéticas serão utilizadas no mínimo oito locos microssatélites polimórficos desenvolvidos para a espécie. Dois locos de mtDNA de origem maternal e dois de cpDNA de origem biparental, encontrados em literatura (NCBI, 2013), e que serão testados quanto a sua transferência e amplificação para *A. polyneuron* para ajudar nas análises de parentesco.

3.4 ANÁLISE DE MICROSSATÉLITE

3.4.1 Isolamento de marcadores microssatélites específicos

Neste estudo, serão isolados marcadores SSR específicos para a espécie. Para isso, serão construídos bancos enriquecidos em microssatélites em que DNA genômico de *A. polyneuron* será digerido pela enzima de restrição *RsaI* e os fragmentos resultantes ligados a dois adaptadores específicos (*primers Rsa-21* e *Rsa-25*), para garantir que todos os fragmentos digeridos tenham uma terminação comum e conhecida. Após, os fragmentos ligados serão amplificados via PCR e o

produto da amplificação será purificado usando o kit “Quiaquick PCR purification kit”. Depois a pré-amplificação com o primer *Rsa21*, os fragmentos contendo microssatélites serão desnaturados a 95°C, incubados com oligos biotinolados Biotina-III (CT)₈ e Biotina III (GT)₈ e selecionados pelo uso de “bolinhas” (beads) magnetizadas cobertas com strepavidina. Os fragmentos selecionados serão amplificados via PCR para gerar fragmentos de fita dupla em grande quantidade e clonados em vetor pGEN-T EASY. No *screening* das bibliotecas, o DNA plasmidial das colônias recombinantes (contendo o inserto) será isolado para posterior sequenciamento. Fragmentos que contenham sequências de DNA com regiões de microssatélites de di- ou trinucleotídeos repetidos mais de cinco vezes serão escolhidos para confecção de *primers* de específicos de microssatélites. Sequências que flaqueiam as regiões de microssatélites serão escolhidas por meio de software específico para confecção dos *primers* a serem usados nas reações de PCR. Após, serão realizadas a otimização de reações de PCR para amplificação dos *primers* desenhados a partir da análise de sequências de clones obtidos das bibliotecas desenvolvidas. A otimização das reações e as temperaturas de anelamento serão determinadas em termociclador com sistema de gradiente de temperatura da MJ Reseach PTC 200 e eletroforese capilar no sequenciador automático 3500xl.

3.4.2 Extração e amplificação de DNA

O DNA genômico dos indivíduo de *A. polyneuron* será extraído de acordo com o protocolo CTAB 2% (Cetyltrimethyl-ammonium bromide) conforme DOYLE; DOYLE (1987) com modificações (TREMETSMERGER et al., 2003). A qualidade do DNA total e a concentração final de cada amostra será determinada por quantificação por espectrofotometria (Scandrop, Analytikjena). As reações de amplificações serão realizadas de acordo com as condições específicas determinadas para os *primers* SSR a serem desenvolvidos para a espécie e o produto final da amplificação será submetido em multiplex à eletroforese capilar em sequenciador automático.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.5.1 Análise da diversidade genética, endogamia, parentesco, tamanho efetivo e equilíbrio de Hardy-Weinberg

A diversidade genética intrapopulacional será caracterizada pelos índices: número médio de alelos por loco (A), número efetivo de alelos por locos (A_e), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada segundo as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e). Também será estimado o índice de fixação (F). Como as amostras vão incluir duas gerações (adultos e regenerantes), serão testadas a aderência das frequências gênicas e genóticas ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), usando o teste exato de Fisher. Os índices de diversidade, o índice de fixação e o teste de EHW serão calculados, usando-se o programa FSTAT (GOUDET, 2002).

3.5.2 Análise da distribuição espacial dos genótipos

Esta análise será realizada com base na estimativa do coeficiente de coancestria (θ_{xy}) entre pares de árvores dentro de classes de distância previamente determinadas, usando o estimador de coancestria proposto por LOISELLE et al. (1995). A significância estatística do coeficiente θ_{xy} será obtida comparando os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade da estimativa média θ_{xy} para cada classe de distância, calculado do erro padrão, em relação a hipótese de ausência de coancestria ($H_0: \theta_{xy}=0$). O coeficiente de coancestria e o erro padrão serão estimados usando o programa SPAGeDi versão 1.3 (HARDY; VEKEMANS, 2003).

3.5.3 Fluxo de pólen e semente

A estimativa do fluxo gênico contemporâneo via pólen e sementes serão obtidas usando análise de parentesco (maternidade e paternidade) e o programa Cervus 3.0 (MARSHALL et al., 1998). As análises serão conduzidas a partir dos genótipos de árvores adultas e de plantas jovens e regenerantes. Os locos citoplasmáticos serão utilizados para determinar qual dos parentes é a mãe e quem

é o pai. Como as sementes da espécie são dispersa pelo vento e o pólen por mariposas, e com uma condição de densidade vegetal alta no local de estudo, servindo como uma barreira para a dispersão de sementes pelo vento, em grandes quantidades, distantes da árvore mãe, quando dois parentes são encontrados dentro da parcela, o mais próximo poderá ser o materno e o mais distante o parente paterno. No caso de apenas detectar um parente dentro da área, este será assumido como o materno. Como todas as árvores e regenerantes terão sua localização geográfica conhecida, será possível determinar o padrão de dispersão de pólen e sementes dentro da parcela.

3.5.4 Dinâmica da endogamia entre gerações

Os possíveis efeitos de seleção entre fase juvenil e fase adulta serão estudados com base em dois modelos determinísticos, propostos por RITLAND (1990). Os modelos a serem adotados inferem sobre a seleção comparando o índice de fixação na fase jovem e na geração adulta, assumindo ausência de equilíbrio de endogamia de Wright (EEW). Estes modelos não determinam a vantagem ou desvantagem de um alelo sobre outro, mas sim, comparam o valor adaptativo dos homozigotos e heterozigotos, portanto, permitem inferir sobre a possível adaptação dos diferentes genótipos nas populações.

Considerando duas gerações, adultos e progênes podem estimar a adaptação relativa dos genótipos (w) por:

$$\hat{w} = \frac{2\hat{t}\hat{F}}{\hat{s}(1 + \hat{F}_p - 2\hat{F})}$$

em que, s é a taxa de autofecundação; t é a taxa de cruzamento multiloco; F é o índice de fixação nas progênes; F_p é o índice de fixação nas geração parental.

A variância de w será estimada com base em RITLAND (1990). Estes modelos não determinam a vantagem ou desvantagem de um alelo sobre outro (s), mas sim, comparam o valor adaptativo dos homozigotos e heterozigotos, portanto, permitem inferir sobre a possível adaptação dos diferentes genótipos nas populações.

4 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade	Semestres					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Isolamento de marcadores SSR	X					
Adequação do protocolo SSR	X	X				
Mapeamento das árvores		X	X	X		
Amostragem de tecidos foliares e câmbio		X	X	X		
Extração do DNA das amostras		X	X	X	X	
Eletroforese			X	X	X	X
Análises estatísticas					X	X
Redação de artigos científicos e tese						X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOCO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology** 17: 5177-5188, 2008.
- AIZEN, M.A.; FEINSIGER. Forest fragmentation, pollination and plant reproduction in a Chaco Dry Forest, Argentina. **Ecology** 75(2): 330-351, 1994.
- ANJOS, L. Consequências biológicas da fragmentação no norte do Paraná. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais** 12(32): 87-94, 1998.
- AZEVEDO, L.H. **Tipos de vegetação**: atlas do Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1959. P. 58.
- BAWA, K.S.; PERRY, D.R.; BEACH, J.H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees: 1- sexual systems and incompatibility mechanisms. **American journal of botany** 72(3): 331-345, 1985.
- BRANDÃO, M.; GAVILANES, M.L. Elementos arbóreos ocorrentes no domínio da Caatinga, no Estado de Minas Gerais e seus empregos. **Informe Agropecuário** 17(181): 34-42, 1994.
- BECKER, J.; HEUN, M. Barley microsatellites: allele variation and mapping. **Plant Molecular Biology** 27: 835-845, 1995.
- BOSHIER, D.H.; BILLINGHAM, M.R. Genetic variation and adaptation in tree populations: Issues of scale and experimentation. In: HUTCHINGS, M.J.; JOHN, L.; STEWART, A. (eds.). **The Ecological Consequences of Environmental Heterogeneity Blackwell Science**, UK. 2000. p. 267–291.

BURCZYK, J.; LEWANDOWSKI, A.; CHALUPKA, W. Local pollen dispersal and distant gene flow in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). **Forest Ecology and Management** 197: 39-48, 2004.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira. Colombo: Embrapa–CNPQ, 1994. p. 640.

CARVALHO, P. E. R. Peroba-Rosa – *Aspidosperma polyneuron*. **Circular técnica 96**. 1.ed. Colombo: Embrapa–CNPQ, 2004. p. 12.

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

CAVALCANTE, M.S.; MONTAGNA, R.G.; LOPEZ, G.A.A.; MUCCI, E.S.F. Durabilidade natural de madeiras em contacto com o solo. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, Campos do Jordão, 1982. **Anais**. São Paulo: Instituto Florestal, 1982. p.1383-1389.

CHIMELO, J.P.; MAINIERI, C.; NAHUIZ, M.A.R.; PESSOA, A.L. Madeiras do Município de Aripuanã, Estado de Mato Grosso: I - caracterização anatômica e aplicações. **Acta Amazônica** 6(4): 94-105, 1976.

CHUNG, M.Y.; CHUNG, J.M.; CHUNG, M.G.; EPPERSON, B.K. Spatial genetic structure in populations of *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae). **Genes Genetic Systematic** 73: 282-285, 1998.

COUVET, D. Deleterious Effects of Restricted Gene Flow in Fragmented Populations. **Conservation Biology** 16(2): 369-376, 2002.

DICK, C. W.; ETCHELECU, G.; AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal of Neotropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology** 12: 753-764, 2003.

DOLIGEZ, A.; BARIL, C.; JOLY, H.I. Fine-Scale Spatial Genetic Structure with Nonuniform Distribution of Individuals. **Genetics** 148: 905-919, 1998.

DURIGAN, G.; LEITÃO FILHO, H. de F. Florística e fitossociologia de matas ciliares do oeste paulista. **Revista do Instituto Florestal** 7(2): 197-239, 1995.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics** 5: 435–445. 2004.

EPPERSON, B.K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. **Plant population genetics, breeding and genetic resources** 1: 229-253, 1990.

EPPERSON, B.K. **Geographical genetics**. Princeton: Princeton University Press. 2003. p. 356.

- EPPELSON, B.K. Multilocus estimation of genetic structure within populations. **Theoretical Population Biology** 65: 227–237, 2004.
- FACHIM, E.; GUARIM, V.L.M.S. Conservação da biodiversidade: espécies da flora de Mato Grosso. **Acta Botanica Brasilica** 9(2): 281-287, 1995.
- FREITAS, M. L. M.; AUKAR, A. P. A.; SEBBENN, A. M.; MORAES, M. L. T.; LEMOS, E. G. M. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP. **Scientia Forestalis** 68: 21-28, 2005.
- GAINO, A.P.S.C.; SILVA, A.M.; MORAES, M.A.; ALVES, P.F.; MORAES, M.L.T.M.; FREITAS, M.L.M.F.; SEBBENN, A.M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão. **Conservation Genetics** 5(11): 1631-1643, 2010.
- GALVÃO, F.; KUNIYOSHI, Y.S.; RODERJAN, C.V. Levantamento fitossociológico das principais associações arbóreas da Floresta Nacional de Irati-PR. **Floresta** 19(1/2): 30-49, 1989.
- GARANT, D.; FORDE, S.E.; HENDRY, A.P. The multifarious effects of dispersal and gene flow on contemporary adaptation. **Functional Ecology** 21: 434-443, 2007.
- GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate *F*-statistics. **Journal Heredity** 86: 485-486, 2002.
- GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica** 113: 163-165, 2000.
- HAMILTON, M. B. Tropical tree gene flow and seed dispersal. **Nature** 401(6749): 129-130, 1999.
- HAMRICK, J.L.; NASON, J.D. Consequences of dispersal in plants. In: RHODES, O.E.; CHESSER, R.K.; SMITH, M.H. (Eds.). **Populations dynamics in ecological space and time**. Chicago: University of Chicago Press, 1996. p. 203-236.
- HAMRICK, J. L. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management** 197: 323-335, 2004.
- HANSON, T.R.; BRUNSFELD, S.J.; FINEGAN, B.; WAITS, L.P. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. **Molecular Ecology** 1: 1-14, 2008.
- HARDY, O.; VEKEMANS, X. **SPAGeDI 1.1**. A program for spatial pattern analysis of genetic diversity. Version for Windows 95. 2002. Disponível em: <<http://www.ulb.ac.be/sciences/ecoevol/software.html> />. Acessado em: 07/2013.

HARDY, O.J.; MAGGIA, L.; BANDO, E.; BREYNE, P.; CARON, J.; CHEVALLIER, M.H.; et al. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. **Molecular Ecology** 15: 559–571, 2006.

INSTITUTO AGRONÓMICO DO PARANÁ. **Cartas Climáticas do Estado do Paraná**. 2000. Disponível em: <<http://www.iapar.br>>. Acesso em: 04/2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Manual técnico da vegetação brasileira** (Manuais Técnicos em Geociências, 1). Rio de Janeiro, 1992. p. 92.

IRWIN, A.J.; HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; SMOUSE, P.E. A multiyear estimate of the effective pollen donor pool for *Albizia julibrissin*. **Heredity** 90: 187–194, 2003.

JUMP, A. S.; PENUÉLAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 103: 8096-8100, 2006.

KLEIN, R. M. A vegetação florestal. In: BIGARELLA, J.J. **Visão integrada da problemática da erosão**. Curitiba: ADEA / IBGE, 1985. p.71-91.

LEITE, P.F.; KLEIN, R.M.; PASTORE, U.; COURA NETO, A.B. **A vegetação da área de influência do reservatório da Usina Hidrelétrica de Ilha Grande (PR/MS): levantamento na escala 1:250.000**. Brasília: IBGE, 1986. P. 52.

LEITE, P.F.; KLEIN, R.M. **Vegetação**. In: Geografia do Brasil: Região Sul. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 2: 113-150, 1990.

LI, J. Z.; SJAKSTE, T. G.; RÖDER, M. S.; GANAL, M. W. Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. **Theoretical and Applied Genetics** 107: 1021-1027, 2003.

LIU, Z. W.; BIYASHEV, R. M.; SAGHAI MAROOF, M. A. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. **Theoretical and Applied Genetics** 93: 869-876, 1996.

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** 82: 1420-1425, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 2. 368 p.

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

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

MARTINS, K. **Diversidade genética e fluxo gênico via pólen e sementes em populações naturais de *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) no Sudeste de Goiás.** Tese Agronomia. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005, p. 128.

MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.; PIMENTA, J. A. **A Bacia do Rio Tibagi.** Londrina: Ed. UEL, 2002. 595 p.

MORELLATO, L. P. C. **Estudo da fenologia de árvores, arbustos e lianas de uma floresta semi-decídua no sudeste do Brasil.** Tese Doutorado. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1991. p. 176.

NASCIMENTO, M.T.; SILVA, G.C. da; ARAGÃO, L.E.O.C. Estrutura e composição florística de um remanescente de mata de tabuleiro na região norte fluminense. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47, 1996, Nova Friburgo. **Resumos.** Rio de Janeiro: Sociedade Botânica do Brasil, 1996. p.208.

NATIONAL CENTER OF INFORMATION BIOTECHNOLOGY (NCBI). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=aspidosperma>. Acessado em: 22/07/2013.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetic and Molecular Biology** 29(2): 294-307. 2006.

PILLEN, K.; BINDER, A.; KREUZKAM, B.; RAMSAY, L. WAUGH, R.; FORSTER, J.; LEON, J. Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. **Theoretical of Applied Genetics** 101: 652-660, 2000.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Science** 1: 215-222, 1996.

RAMSAY, L.; MACAULAY, M.; IVANISSEVICH, D. S.; MACLEAN, K.; CARDLE, L.; FULLER, J.; EDWARDS, K. J.; TUVESON, S.; MORGANTE, M.; MASSARI, A.; MAESTRI, E. MARMIROLI, N.; SJAKSTE, T.; GANAL, M.; POWELL, W.; WAUGH, R. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. **Genetics** 156: 1997-2005, 2000.

RAMSAY, L.; RUSSELL, J.; MACAULAY, M.; BOOTH, A.; THOMAS, W.T. B.; WAUGH, R. Variation shown by molecular markers in barley: genomic and genetic constraints. **Aspects of Applied Biology** 72: 147-154, 2004.

RITLAND, K. Inferences about inbreeding depression based on changes of the inbreeding coefficient. **Evolution** 44: 1230-1241, 1990.

RIZZINI, C.T. Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica (florístico-sociológica) do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia** 25: 3-64, 1963.

SAGHAI, M. A.M.; BIYASHEV, R. M.; YANG, G. P.; ZHANG, Q.; ALLARD, R. W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Science** 91: 5466-5470, 1994.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low 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** 106: 134-145, 2011.

SEOANE, C. E. C; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema reprodutivo em populações de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal** 13: 19-26, 2001.

SIQUEIRA, A.C.M.F.; NOGUEIRA, J.C.B. Essências brasileiras e sua conservação genética no Instituto Florestal de São Paulo. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2, 1992, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Instituto Florestal, 1992. p.1187.

SMITH-RAMÍREZ, C.; ROVERE, A.E.; NÚÑEZ-ÁVILA, M.C.; ARMESTO, J.J. Habitat fragmentation and reproductive ecology of *Embothrium cocineum*, *Eucryphia cordifolia* and *Aextoxicon punctatum* in Southern Temperate Rainforests. In: NEWTON, A.C. **Biodiversity loss and conservation in fragmented forest landscapes**. Wallingford: CABI. 2007. 416p.

SOUZA, L. A. de.; MOSCHETA, I. S. Morfo-anatômia do desenvolvimento do fruto e da plântula de *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 38., 1987, São Paulo. **Resumos**. São Paulo: Sociedade Botânica do Brasil / Universidade de São Paulo, 1987. p.345.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (Bombacaceae). **Scientia Forestalis** 65: 70-79, 2004.

STRUSS, P.; PLIESKE, J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. **Theoretical and Applied Genetics** 97: 308-315, 1998.

THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R. K.; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 106: 411-422, 2003.

TOREZAN, J. M. D. 2004. Estrutura de paisagens fragmentadas e prioridades para a conservação da biodiversidade. In: DISPERATI, A. A.; SANTOS, J. R. (eds). **Aplicações de geotecnologias na Engenharia Florestal**. FUPEF.Curitiba. p. 138-149.

TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.F.; SAMUEL, A.M.; BAEZA, C.M.; FAY, F.M. Genetics of colonization in *Hypochaeris tenuifolia* (Asteraceae, Lactuceae) on Volcán Lonquimay, Chile. **Molecular Ecology** 12: 2649–2659. 2003.

VARSHNEY, R. K.; GROSSE, I.; HAHNEL, U.; SIEFKEN, R.; PRASAD, M.; STEIN, N.; LANGRIDGE, P.; ALTSCHMIED, L.; GRANER, A. Genetic mapping and BAC assignment of EST-derived SSR markers proves non-uniform distribution of genes in the barley genome. **Theoretical and Applied Genetics** 113: 239-250, 2006.

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

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro. 1991.123p.

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

VICENTE, R. F. O Parque Estadual Mata dos Godoy. In: TOREZAN, J.M.D. (Org.). **Ecologia do Parque Estadual Mata dos Godoy**. Londrina: ITEDES, 2006. p. 13-18.

VICENTE, R.F.; VANZELA, A.L.L.; TOREZAN, J.M. Representatividade de Ecosistemas no Sistema de Unidades de Conservação no Estado do Paraná, Brasil. **Natureza & Conservação** 7: 30-49, 2009.

ZENG, X.; MICHALSKI, S.G.; FISCHER, M.; DURKA, W. Species diversity and population density affect genetic structure and gene dispersal in a subtropical understory shrub. **Journal of Plant Ecology** 1: 1-9, 2011.

WARD, M.; DICK, C.W.; GRIBEL, R.; LOWE, A.J. To self or not to self. A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in Neotropical trees. **Heredity** 95: 246-254, 2005.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution** 11:413- 418, 1996.

YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Effects of logging and other forms of harvesting on genetic diversity in humid tropical forest. In: YOUNG, A. G.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. J. **Forest conservation genetics**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000a. p.115-123.

YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics**. Canberra: CSIRO Publishing, 2000b. p.123-134.