

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

I

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Florestas  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## **Documentos 247**

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

Vinícius Sandri Diaz  
Carlos Eduardo Sícoli Seoane  
Paulo Yoshio Kageyama  
Alexandre Magno Sebbenn

Embrapa Florestas  
Colombo, PR  
2013

## **Embrapa Florestas**

Estrada da Ribeira, Km 111, Guaraituba,  
83411-000, Colombo, PR - Brasil  
Caixa Postal: 319  
Fone/Fax: (41) 3675-5600  
www.cnpf.embrapa.br  
cnpf.sac@embrapa.br

## **Comitê Local de Publicações**

Presidente: Patrícia Póvoa de Mattos  
Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida  
Membros: Alvaro Figueredo dos Santos, Claudia Maria Branco de Freitas Maia, Elenice Fritzsos, Guilherme Schnell e Schuhli, Jorge Ribaski, Luis Claudio Maranhão Froufe, Maria Izabel Radomski, Susete do Rocio Chiarello Penteadó

Supervisão editorial: Patrícia Póvoa de Mattos  
Revisão de texto: Patrícia Póvoa de Mattos  
Normalização bibliográfica: Francisca Rasche  
Editoração eletrônica: Rafeale Crisostomo Pereira  
Foto da capa:

## **1ª edição**

Versão digital (2013)

### **Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Florestas**

---

Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico em populações de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) na área de entorno do Parque Nacional do Iguaçu [recurso eletrônico] / Vinícius Sandri Dias... [et al.]. Dados eletrônicos - Colombo : Embrapa Florestas, 2013.  
(Documentos / Embrapa Florestas, ISSN 1980-3958 ; 247)

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/item/221>>

Título da página da web (acesso em 27 jan. 2014).

1. Conservação. 2. Diversidade genética. 3. *Ilex paraguariensis* 4. Parque Nacional do Iguaçu. I. Diaz, Vinícius Sandri. II. Seoane, Carlos Eduardo Sicole. III. Kageyama, Paulo Yoshio. IV. Sebbenn, Alexandre Magno. V. Série.

CDD 631.52 (21. ed.)

---

© Embrapa 2013

# **Autores**

## **Vinícius Sandri Diaz**

Tecnólogo em Gestão Ambiental  
Mestre em Ciências Florestais - ESALQ/USP  
vinicius.s.d@gmail.com

## **Carlos Eduardo Sícoli Seoane**

Biólogo, Doutor  
Pesquisador da Embrapa Florestas  
eduardo.seoane@embrapa.br

## **Paulo Yoshio Kageyama**

Engenheiro-agronômo, Doutor  
Professor titular da Universidade de São Paulo  
paulo.kageyama@usp.br

## **Alexandre Magno Sebbenn**

Engenheiro florestal, Doutor  
Pesquisador do Instituto Florestal de São Paulo  
alexandresebbenn@yahoo.com.br



# Apresentação

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

Sergio Gaiad  
Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento  
Embrapa Florestas



# Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Material e métodos</b> .....	<b>12</b>
2.1. Área de estudo e caracterização da vegetação .....	12
3.3 Análises de laboratório .....	14
<b>4. Análise dos dados</b> .....	<b>15</b>
4.1 Análise da diversidade genética e índice de fixação.....	15
4.2 Análise da estrutura genética espacial intrapopulacional .....	16
4.3 Análise de parentesco .....	16
<b>5. Resultados</b> .....	<b>17</b>
5.1. Distribuição espacial da <i>I. paraguariensis</i> .....	17
5.1. Diversidade genética e índice de fixação.....	20
5.2. Diversidade genética dentro das populações .....	21
5.3 Distribuição da diversidade genética .....	22
5.4. Estrutura genética espacial intrapopulacional.....	23
5.5 Parentesco e fluxo gênico.....	25
<b>6. Discussão</b> .....	<b>29</b>
6.1. Diversidade genética .....	29
6.2. Estrutura genética espacial .....	32
6.3. Fluxo gênico de pólen e sementes .....	33
6.4. Implicações para conservação .....	37
<b>7. Conclusões</b> .....	<b>38</b>
<b>8. Referências</b> .....	<b>39</b>



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

---

*Vinicius Sandri Diaz*

*Carlos Eduardo Sícoli Seoane*

*Paulo Yoshio Kageyama*

*Alexandre Magno Sebbenn*

## **1. Introdução**

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

No Brasil, a conversão do Bioma Mata Atlântica em áreas agrícolas e urbanas reduziu drasticamente a extensão original

do Bioma. Atualmente, as áreas remanescentes encontram-se severamente fragmentadas, com tamanho reduzido, dispersas e isoladas pela matriz antrópica (RODRIGUES et al., 2009).

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

O estudo do fluxo gênico de espécies arbóreas é de grande relevância devido à grande interação destas com polinizadores e dispersores de sementes. Pressões antrópicas como o desmatamento e a fragmentação são as principais ameaças a populações naturais de muitas espécies. Por serem, em sua maioria, de cruzamento, são sensíveis ao efeito da endogamia (KAGEYAMA et al., 1998; YOUNG; BOYLE, 2000). Estudos demonstram que a redução do habitat natural, a subdivisão e o isolamento das populações provocam consequências negativas no sucesso reprodutivo, impedindo por vezes, o fluxo gênico e a migração de sementes (HALL et al., 1996; SEOANE et al., 2005a, 2005b; SEBBENN et al., 2011). O fluxo gênico é essencial para a manutenção da variabilidade genética das populações naturais da floresta tropical e o seu monitoramento pode subsidiar estratégias de conservação.

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

*Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida por erva-mate, é de ciclo de vida longo, característica da Floresta Ombrófila Mista, de grande interação com a fauna para polinização e dispersão de sementes. É amplamente consumida no país na forma de chimarrão, chá, tererê e como planta medicinal. O cultivo e a exploração de ervais nativos é uma importante atividade econômica, principalmente de pequenas propriedade dos estados do sul do Brasil (CARVALHO, 2003). Desta forma, a erva-mate é um dos principais produtos florestais não madeireiros do país (ALMEIDA et al., 2009). Apesar de sua importância econômica e ecológica, são escassos os estudos de conservação e genética da espécie. É uma espécie diplóide ( $2n = 40$ ), com meiose regular, sem indicação de bivalentes heteromórficos (GREIZERSTEIN et al., 2004). Apresenta flores díclinas, com um dos sexos abortivos. É uma espécie clímax tolerante à sombra. Em estado natural, a erva-mate é uma espécie umbrófila, de crescimento lento a moderado, típica de floresta madura, que pode atingir a densidade de centenas de indivíduos por hectare (CARPANEZZI, 1995). Sua área de distribuição natural de acordo com Oliveira e Rotta (1983) abrange as latitudes  $21^{\circ}$  a  $30^{\circ}$  S, e longitudes de  $48^{\circ}30'$  a  $56^{\circ}10'W$ , e altitudes entre 500 m e 1.000 m. A espécie também pode ocorrer de forma mais esparsa em regiões abaixo ou acima deste limite. É uma espécie de cruzamento obrigatório, entomofílica, sem especificidade de polinizadores, sendo polinizada principalmente por insetos dos ordens dos Dípteros, Himenópteros, Coleópteros e Hemípteros (FERREIRA et al., 1983), com polinização pelo vento inexistente ou muito reduzida. Seu período de floração ocorre de setembro a outubro, no Rio Grande do Sul; de setembro a novembro no Paraná; de setembro até novembro, em Santa Catarina; e em novembro, no Estado de São Paulo (CARVALHO, 2003).

No contexto de subsidiar estratégias de conservação biológica, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética, a estrutura genética espacial e o fluxo gênico das duas populações

naturais de *I. paraguariensis*, na área do entorno do Parque Nacional do Iguaçu, com oito locos microssatélites. Também se objetivou comparar a diversidade genética entre indivíduos adultos e regenerantes nos dois fragmentos, caracterizar a estrutura populacional e a regeneração nos dois fragmentos, mensurar a estrutura genética espacial, estabelecer a taxa de migração de pólen e sementes, e estimar distâncias médias de fluxo gênico via pólen e sementes nos dois fragmentos. As hipóteses do presente estudo são: i) As árvores adultas apresentarão maior diversidade genética que as plântulas nas duas populações; ii) Existe estrutura genética espacial nos indivíduos adultos e nas plântulas nas duas populações; iii) O fluxo de pólen será mais restrito que o fluxo de sementes e; iv) O fluxo gênico por sementes de áreas externas à estudada será maior que o fluxo de pólen.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Área de estudo e caracterização da vegetação

O Parque Nacional do Iguaçu (PARNA Iguaçu) é o segundo parque nacional brasileiro, criado em 10 de janeiro de 1939 pela Lei nº 1.035. Atualmente, sua área total abrange 185.262,2 ha apenas no território brasileiro. Em 1986 recebeu o título de Patrimônio Natural da Humanidade, concedido pela UNESCO. Com uma das mais espetaculares cataratas do mundo, o PARNA Iguaçu abriga a maior e mais importante área de floresta Estacional Semidecídica do País (ICMBIO, 2012). O clima na região próximo ao Parque Nacional do Iguaçu, segundo a classificação de Koeppen, é do tipo Cfa, subtropical úmido ou mesotérmico com verão quente, temperaturas médias entre 15 °C a 25 °C, e índice pluviométrico entre 1.500 mm a 2.000 mm anuais, tendo os meses de outubro a janeiro como os mais chuvosos. Nas áreas mais altas, acima de 600 m, ocorrem remanescentes de Floresta Ombrófila Mista. As maiores árvores da região podem atingir até 35 m de altura, sendo comum encontrar, nas partes

bem conservadas, troncos com mais de um metro de diâmetro (ZILLER, 1998). Os fragmentos estudados estão localizados na área de entorno do PARNA Iguaçu, nos Municípios de Santa Terezinha de Itaipu e São Miguel do Iguaçu. A Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Santa Maria encontra-se em linha reta a uma distância aproximada de 3,7 km do Parque Nacional do Iguaçu. O fragmento Fazenda dos Paulistas está a uma distância aproximada de 3,9 km do parque. Os fragmentos estão separados entre si por uma distância aproximada de 18,1 km.

A Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Santa Maria é uma unidade de conservação localizada na Fazenda Santa Maria. Apresenta uma área de aproximadamente 320 ha. O fragmento está localizado nas latitudes 25° 29' 08'' a 25° 30' 15'' S e longitudes 54° 21' 26'' a 54° 22' 26'' O, a uma elevação média de 296 m, com mínima de 283 m e máxima de 338 m.

A outra área de estudo localiza-se na Fazenda dos Paulistas. O fragmento apresenta uma área de aproximadamente 320 ha, de tamanho muito similar a RPPN Santa Maria, e está localizado nas latitudes 25° 24' 19.5'' a 25° 26' 04.1' 'S e longitudes 54° 10' 33.6'' a 54° 11' 33.2'' O, a uma elevação média de 259 m, com mínima de 226 m e máxima de 309.

Durante as primeiras visitas de campo para o planejamento do experimento, foi observada a baixa densidade populacional da *I. paraguariensis* na região do estudo. Devido a esta característica da distribuição espacial, foi possível a realização do censo na área total dos dois fragmentos, onde todos os indivíduos de *I. paraguariensis* observados foram georreferenciados e tiveram amostras foliares coletadas para extração de DNA. Também foi medida a circunferência à altura do peito (CAP) dos indivíduos com altura acima de 1,30 m e nas plântulas foi medida a altura com uso de fita métrica. Os indivíduos foram marcados com plaquetas metálicas, devidamente numeradas.

### 3.3 Análises de laboratório

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o procedimento adaptado de Doyle e Doyle (1987). Após as extrações, as amostras foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Devido a dificuldades na amplificação, provavelmente devido a compostos secundários da *I. paraguariensis*, após a extração as amostras foram submetidas a um processo de purificação de DNA. Dentre os vários protocolos testados, o que apresentou melhor resultado foi a purificação com acetato de amônio (OLIVEIRA et al., 2007).

A quantificação do DNA foi realizada por meio da análise comparativa com amostras de concentração conhecida ( $\lambda$ ). O DNA das amostras e o  $\lambda$  foram submetidos à eletroforese durante 30 min, em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Posteriormente, as amostras foram diluídas a  $2,5\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$  em água Miliq.

A amplificação das amostras foi conduzida por um mix com a seguinte composição: 7,5 ng de DNA genômico, 250  $\mu\text{M}$  de dNTP, 0,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ , tampão para PCR 1X (10mM de Tris-HCl, 50mM de KCl, 1,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,3), 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de BSA, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada iniciador e 1U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi realizada em termociclador do tipo MJ Research PTC-100, utilizando-se o seguinte protocolo: 94  $^{\circ}\text{C}$  por 5 min; 30 ciclos de 94  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min, temperatura de hibridação específica de cada par de iniciadores por 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min e terminando com 72  $^{\circ}\text{C}$  por 7 min.

Os indivíduos foram genotipados com uso de oito marcadores microssatélites nucleares, desenvolvidos para a espécie por Pereira et al. (2013). Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados em gel desnaturante de poli(acrilamida) a 5%, em corrida de uma 1h30 min em tampão TBE 1X, em cuba

vertical, pré-aquecida por no mínimo 40 min. Posteriormente, foram revelados com coloração de nitrato de prata, seguindo o protocolo de Creste et al. (2001). Os géis foram interpretados depois de secarem por cerca de 24 h, escaneados e posteriormente descartados. O tamanho dos alelos foi estimado através da comparação com marcador de peso molecular padrão aplicado no gel com tamanho de 10-pb ladder. Foram considerados alelos distintos os fragmentos que diferiram por pelo menos dois nucleotídeos.

## 4. Análise dos dados

### 4.1 Análise da diversidade genética e índice de fixação

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

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

### 4.2 Análise da estrutura genética espacial intrapopulacional

A estrutura genética espacial (EGE) intrapopulacional foi estimada utilizando o coeficiente de coancestria média ( $\theta_{xy}$ ) proposto por Loiselle et al. (1995), entre pares de árvores

adultas/jovens e pares de plântulas, com o programa SPAGEDI versão 1.3 (HARDY; VEKEMANS, 2002). Para visualizar a EGE, os valores  $\theta_{xy}$  foram calculados sobre um conjunto de oito classes de distância. Para testar se os valores médios diferiram significativamente de zero, um intervalo de confiança a 95% foi calculado para cada valor observado em cada classe de distância, através de 10.000 permutações. O intervalo de confiança foi utilizado para construir o correlograma no gráfico, conjuntamente com os valores observados.

### 4.3 Análise de parentesco

A estimativa do fluxo gênico contemporâneo de pólen e sementes foi realizada através da análise de parentesco, utilizando o programa Cervus 3.0 (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI et al., 2007). Para tanto, foram comparados os genótipos das plântulas e adultos realizando-se o teste de exclusão de paternidade e maternidade. A análise de parentesco foi realizada por atribuição de máxima verossimilhança (MEAGHER, 1986), com base nos genótipos multilocus das 58 árvores adultas e 50 plântulas da Fazenda dos Paulistas, e das 34 árvores adultas e 10 plântulas da RPPN Santa Maria. Os pares de pais e mães prováveis foram determinados pela estatística  $\Delta$  (MARSHALL et al., 1998), utilizando por referências as frequências alélicas da população adulta (MEAGHER; THOMPSON, 1987). A simulação gera valores críticos, de modo que a significância dos valores de  $\Delta$  encontrados nos testes de parentesco possa ser determinada. Para simulação foram utilizadas 10.000 repetições com taxa de erro de genotipagem de 0,01 e intervalo de confiança restrito a 95%, para determinar um provável parental (MARSHALL et al., 1998). Considerou-se um provável parental ou um par de prováveis parentais os valores de  $\Delta$  maiores que o valor crítico calculado por meio de simulações, em comparação com os indivíduos selecionados ao acaso. As plântulas que apresentaram ambos os parentais dentro das duas populações foram utilizadas para determinar as distâncias média, mediana, mínima e máxima da dispersão de pólen.

Por não ter sido possível identificar o sexo das árvores durante as etapas de coleta no campo nas duas populações, foram realizadas duas estimativas para determinar a suposta árvore doadora de sementes e a suposta árvore doadora de pólen, a partir da posição espacial das plântulas. A primeira estimativa considerou o parental mais espacialmente próximo à plântula como árvore doadora de sementes e o parental localizado mais distante como árvore doadora de pólen. A segunda estimativa considerou o parental mais espacialmente distante à plântula como árvore doadora de sementes e o parental localizado mais perto como árvore doadora de pólen. As duas estimativas foram realizadas para as plântulas que apresentaram ambos os parentais dentro das duas populações. Se apenas um único genitor foi identificado nas populações, assumiu-se que o mesmo seria o parental maternal.

## 5. Resultados

### 5.1. Distribuição espacial da *I. paraguariensis*

A distribuição espacial da *I. paraguariensis* na RPPN Santa Maria foi agregada, com localização em solos predominantemente encharcados nas margens de rios e nascentes do fragmento. Foram encontrados 85 indivíduos adultos e/ou jovens, com diâmetro a 1,30 m do solo (DAP) médio de 6,24 cm (0,95 – 41,22 cm). A população apresentou majoritariamente indivíduos com DAP abaixo de 10 cm (Figura 1). A densidade dos indivíduos adultos e/ou jovens da RPPN Santa Maria foi relativamente muito baixa, com 0,27 indivíduos por hectare. Foram encontradas 70 plântulas, que em sua maioria, estavam localizadas próximas as árvores adultas e/ou jovens, e apresentaram altura média de 82,8 cm, com mínima de 7 cm e máxima de 130 cm (Figura 2).

## a) DAP

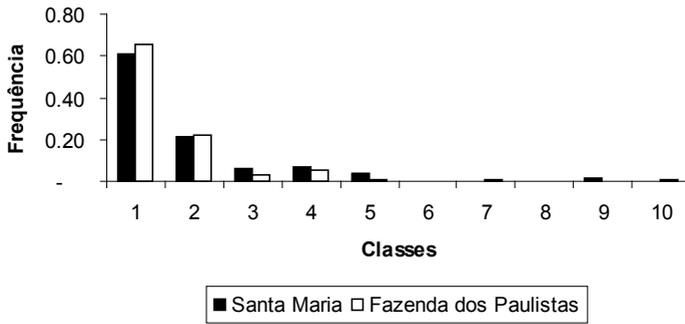


Figura 1. Distribuição do DAP (cm) dos indivíduos adultos da RPPN Santa Maria e da Fazenda dos Paulistas.

## b) Altura (cm)

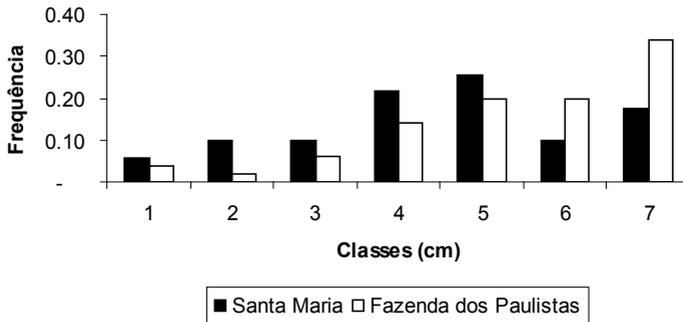


Figura 2. Distribuição da altura das plântulas (cm) da RPPN Santa Maria e Fazenda dos Paulistas.

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

### 5.1. Diversidade genética e índice de fixação

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

Na amostra total de 152 indivíduos o número total de alelos foi 34, com média de 4,25, variando de 3 a 7 alelos por loco (Tabela 1). A heterozigosidade observada variou de 0,143 a 0,800, com média de 0,401. A heterozigosidade esperada oscilou entre 0,154 a 0,754, com média de 0,424.

O índice de fixação foi positivo na média dos locos, com valor de 0,054 e variando de -0,202 a 0,295. Porém não foi observado desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Tabela 1). Os 8 locos não apresentaram desequilíbrio de ligação, portanto, foram ideais para análise de parentesco.

**Tabela 1.** Índices de diversidade genética.

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

A = número de alelos;  $H_o$  = heterozigosidade observada;  $H_e$  = heterozigosidade esperada; F = índice de fixação;  $P_{Pair}$  = probabilidade de exclusão do primeiro parental.

## 5.2. Diversidade genética dentro das populações

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

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

**Tabela 2.** Diversidade genética e índices de fixação de árvores adultas/jovens e plântulas da RPPN Santa Maria.

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

A = número de alelos;  $H_o$  = heterozigosidade observada;  $H_e$  = heterozigosidade esperada; F = índice de fixação; nc = não calculado.

**Tabela 3.** Diversidade genética e índices de fixação de árvores adultas/jovens e plântulas da Fazenda dos Paulistas.

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

A = número de alelos;  $H_o$  = heterozigosidade observada;  $H_e$  = heterozigosidade esperada; F = índice de fixação; nc = não calculado.

### 5.3 Distribuição da diversidade genética

Comparativamente, a distribuição da diversidade genética foi maior entre do que dentro das populações. A variação foi de 7,67% entre os adultos das duas populações, 8,09% entre os adultos da Fazenda dos Paulistas e as plântulas da RPPN Santa Maria, 8,98% entre os adultos da RPPN Santa Maria e as plântulas da Fazenda dos Paulistas. Dentro das amostras, adultos e plântulas da RPPN Santa Maria apresentaram variação de 2,51%. Na Fazenda dos Paulistas a variação foi de 1,87% entre adultos e plântulas (Tabela 4).

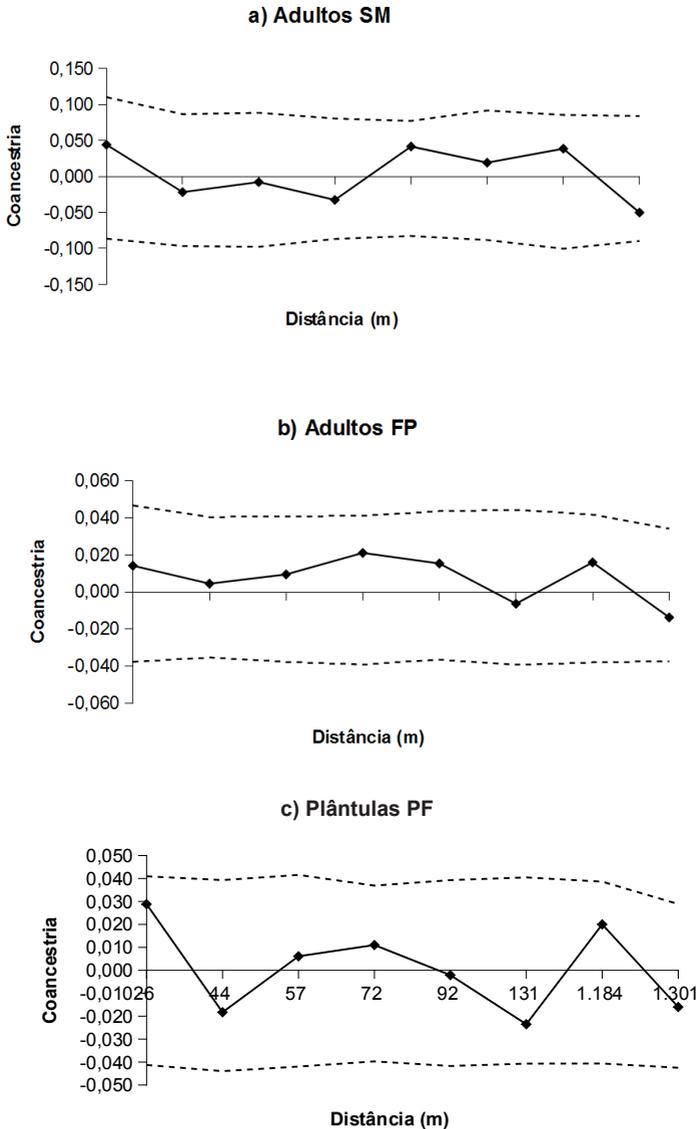
**Tabela 4.** Diferenciação genética entre populações utilizando a estatística  $F_{ST}$  com base no método de Weir e Cockerham (1984).

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

ADSM (adultos RPPN Santa Maria), PLSM (plântulas RPPN Santa Maria), ADFP (adultos Fazenda dos Paulistas), PFLP (plântulas Fazenda dos Paulistas).

#### 5.4. Estrutura genética espacial intrapopulacional

A análise da estrutura genética espacial foi realizada para os adultos das duas populações somente para as plântulas da Fazenda dos Paulistas, devido à baixa genotipagem das mesmas na RPPN Santa Maria. Os valores não foram significativamente maiores do que o limite superior do intervalo de confiança de 95%. Portanto, não foi observado estrutura genética espacial entre os adultos das duas populações e entre as plântulas da Fazenda dos Paulistas (Figura 3). Os resultados obtidos sugerem não existir EGE para a *I. paraguariensis* nas duas populações.



**Figura 3.** Correlogramas do coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) para classes de distância entre árvores adultas da *I. paraguariensis* na RPPN Santa Maria (a), árvores adultas da Fazenda dos Paulistas, e plântulas da fazenda dos Paulistas (c). Linhas pontilhadas significam o limite do intervalo de confiança de 95%.

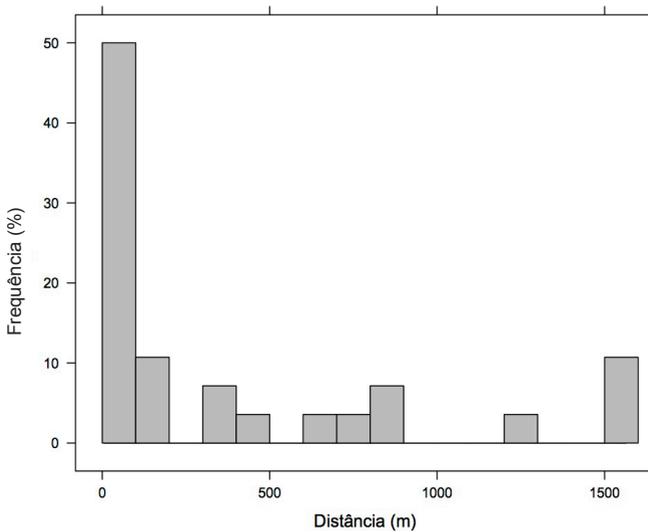
## 5.5 Parentesco e fluxo gênico

Todas as plântulas analisadas pelo teste de parentesco e fluxo gênico apresentaram os parentais no próprio fragmento de ocorrência, ou seja, não foi possível detectar migração por pólen e por sementes no presente trabalho. O teste de parentesco foi realizado para 28 plântulas, utilizando no mínimo 4 e no máximo 8 locos, com probabilidade de exclusão do primeiro parental entre 0,650 a 0,988 (Tabela 1). Do total das plântulas analisadas, 2 são pertencentes a RPPN Santa Maria e 26 plântulas pertencentes a Fazenda dos Paulistas. A média e mediana da distância de dispersão de pólen foi respectivamente 393 e 96 m, com mínima de 2 m e máxima de 1.589 m (Tabela 5). A análise da distribuição espacial do fluxo de pólen estimou em 60,7% da dispersão em distâncias inferiores a 140 m, 85,7% da dispersão em distâncias até 834 m, e apenas 14,3% da dispersão de pólen em distâncias superiores a 1.000 m (Figura 4).

A estimativa de dispersão de sementes mínima apresentou média e mediana de dispersão de 421 e 82 m, com mínima de 1 m e máxima de 1.932 m. Pela estimativa de dispersão máxima, a média e mediana de dispersão de sementes foi 740 m e 481 m, com mínima de 4 m e máxima de 1.949 m (Tabela 5).

**Tabela 5.** Distâncias de dispersão de pólen de sementes máxima e de sementes mínima.

	<b>Pólen</b>	<b>Sementes mín.</b>	<b>Sementes máx.</b>
Média (m)	392	421	740
Desvio (m)	523	666	718
Mín. (m)	2	1	4
Max. (m)	1.589	1932	1.949
Mediana (m)	96	82	481



**Figura 4.** Frequência da distância de dispersão de pólen.

Pela estimativa de dispersão de sementes mínima, aproximadamente 64,3% da dispersão de sementes ocorreu em distâncias inferiores a 100 m, 71,43% da dispersão foi realizada em distâncias inferiores a 160 m, e apenas 14,29% da dispersão de sementes ocorreu em distâncias superiores a 1.000 m (Figura 5). Pela estimativa de dispersão de sementes máxima, apenas 35,71% da dispersão de sementes foi realizado em distâncias inferiores a 100 m, 75% da dispersão foi realizado em distâncias até 1.320 m, com 32,14% do total da dispersão de sementes em distâncias superiores a 1.000 m (Figura 6).

Os dados da análise de parentesco realizado para as plântulas das duas populações, com os respectivos LOD score estão assinalados na Tabela 6. Os resultados com LOD score positivo implicam em maior probabilidade dos candidatos serem os respectivos parentais, em comparação com os indivíduos selecionados ao acaso.

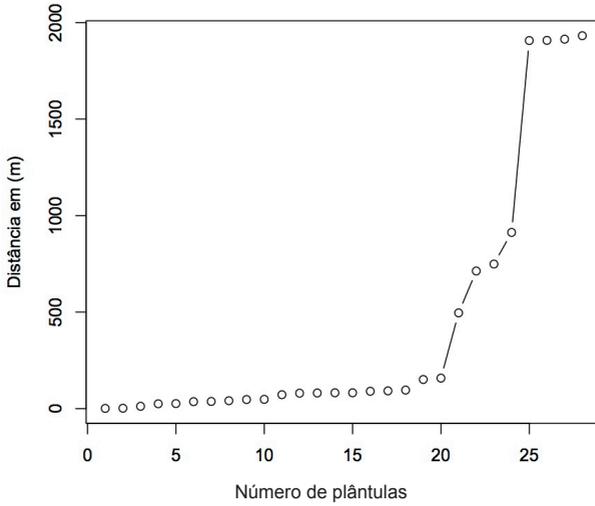


Figura 5. Distribuição da dispersão de sementes pela estimativa de distância mínima.

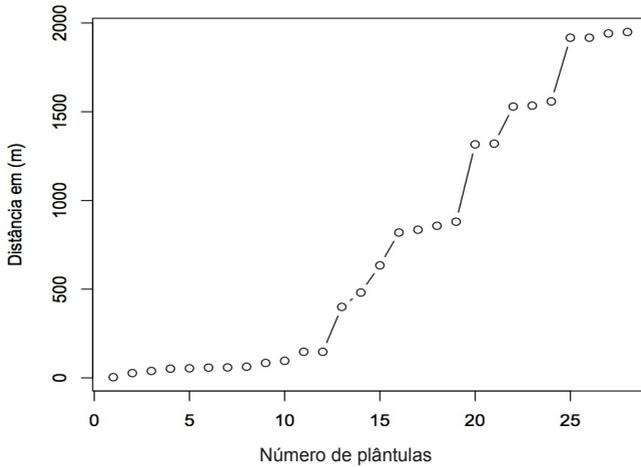


Figura 6. Distribuição da dispersão de sementes pela estimativa de distância máxima.

**Tabela 6.** Análise de parentesco das duas populações.

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

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

## 6. Discussão

### 6.1. Diversidade genética

*I. paraguariensis* é uma espécie com ampla área de distribuição natural, dioica, de ciclo de vida longo e de interação com a fauna para polinização e dispersão de sementes. Contudo, a diversidade genética encontrada para os oito locos das duas populações naturais foi relativamente baixa, apresentando média de 4,25 alelos por loco (Tabela 1). Baixos níveis de diversidade genética foram encontrados em outros estudos com marcadores isoenzimático (WENDT, 2005) e RAPD para *I. paraguariensis* (CANSIAN, 2003). Todavia, é necessário considerar que o presente trabalho foi desenvolvido em área limítrofe da distribuição natural de *I. paraguariensis*.

Este padrão de diversidade genética observado para *I. paraguariensis* difere de trabalhos com outra espécie do gênero *Ilex*, a *I. leucoclada*, onde foram encontrados níveis elevados de diversidade genética (TORIMARU; TOMARU, 2005; TORIMARU, et al., 2007). Por ser o único estudo populacional com marcadores microssatélites para *I. paraguariensis* e também por ter sido desenvolvido em área limítrofe da distribuição natural, estes resultados podem não representar o padrão de diversidade genética da espécie. Entretanto, resultados semelhantes, de populações pequenas e com baixa densidade, foram encontrados por Silva et al. (2008) em estudo com a espécie arbórea tropical *Bagassa guianensis*; tais resultados possivelmente indicam uma tendência a baixa diversidade genética em populações com estas características.

Entre as populações, a diversidade genética encontrada para as plântulas da Fazenda dos Paulistas foi ligeiramente superior a dos indivíduos adultos, o que também refletiu na heterozigosidade esperada e observada (Tabela 4). Estes resultados diferem de outros estudos, onde foi encontrada uma tendência de menor

diversidade genética para as plântulas em comparação com as árvores adultas (RATHMACHER et al., 2010; RESENDE et al., 2011; SEBBENN et al., 2011).

Na RPPN Santa Maria a diversidade genética foi baixa entre adultos e plântulas sendo menor para a última, o que também refletiu na heterozigosidade esperada e observada (Tabela 2). Entretanto, estes resultados podem ser devido a baixa amostragem por problemas na genotipagem dos indivíduos desta população, que apresentaram para este aspecto, situação mais crítica que na Fazenda dos Paulistas.

O índice de fixação foi positivo na média para todos os locos, porém não foi observado desvio do EHW (Tabela 1). Em outro trabalho com marcadores isoenzimáticos foi observada diferença no índice de fixação entre adultos e plântulas para *I. paraguariensis*, o que poderia indicar seleção favorável ao heterozigoto (WENDT, 2005).

Com baixa divergência, a distribuição da diversidade genética foi proporcional a distância das amostras, apresentando variação entre 1,87% a 8,98%. A variação foi menor entre adultos e plântulas da mesma população e aumentou entre as plântulas e adultos de populações distintas. A divergência genética foi maior entre os adultos de uma população e plântulas de outra, com divergência entre 8,09% a 8,98% (Tabela 4). Estes resultados diferem de outros estudos com uso de marcadores RAPD para *I. paraguariensis*, onde a divergência genética encontrada foi maior dentro do que entre populações (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; WENDT, 2005; WENDT et al., 2007; WINGE et al., 1995). Em estudos com marcadores isoenzimáticos também foi encontrado maior divergência genética entre populações geograficamente mais distantes, entretanto, com a principal divergência genética devido à variabilidade intrapopulacional (WENDT, 2005; WINGE et al., 1995).

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

O isolamento das duas populações devido à fragmentação, pode estar influenciando na diferença dos resultados obtidos. Os dois fragmentos pertencem à área de entorno do PARNA Iguaçu. Contudo, o fluxo gênico oriundo de outras populações naturais de *I. paraguariensis* pode ser muito baixo nas duas áreas, o que poderia explicar a maior divergência genética entre do que dentro das populações. Algum fluxo gênico poderia justificar a diferença na diversidade genética entre plântulas e adultos na Fazenda dos Paulistas, o que explicaria a maior diversidade genética das plântulas pela imigração de sementes. Entretanto, pela análise de parentesco, não foi possível detectar migração de pólen e de sementes na Fazenda dos Paulistas.

## 6.2. Estrutura genética espacial

Para compreender o padrão espacial da diversidade genética das duas populações de *I. paraguariensis* é necessário considerar as características ecológicas da espécie e do local ocorrência. A *I. paraguariensis* apresenta alta plasticidade de ambientes, e sua área de ocorrência natural abrange variadas formações ecológicas, o que inclui desde a Floresta Ombrófila Densa até o Cerrado. Entretanto, sua área de ocorrência típica é a Floresta Ombrófila Mista Montana, onde chega a atingir densidade superior a centenas de indivíduos por hectare (CARPANEZZI, 1995). Neste trabalho, a espécie apresentou distribuição agregada, com populações pequenas e com baixa densidade populacional, apresentando entre 0,27 a 0,29 árvores por

hectare, distribuídas preferencialmente em locais com umidade no solo. Este padrão de distribuição, em agregados de indivíduos, pode estar relacionado a fatores como fertilidade ou umidade do solo e condições microclimáticas específicas. Desta forma, a distribuição da espécie sugere existir condições diferenciais para a germinação e/ou estabelecimento das plântulas de acordo com características edáficas.

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

Apesar de *I. paraguariensis* apresentar distribuição espacial em agregados de indivíduos, os índices de coancestria foram baixos e seus valores não ultrapassaram o limite do intervalo de confiança (Figura 3). Portanto, não foi observada EGE entre os adultos das duas populações e entre as plântulas da Fazenda dos Paulistas. A ausência de EGE pode estar relacionada ao grande potencial de dispersão de sementes da espécie, apesar de que vários estudos de índices de coancestria para plântulas em outras espécies arbóreas tropicais cujas sementes também são dispersas por aves não sugerem tal relação (MORAN; CLARK, 2012; ZHOU; CHEN, 2010).

### **6.3. Fluxo gênico de pólen e sementes**

*I. paraguariensis* é uma espécie polinizada por uma grande variedade de insetos (FERREIRA et al., 1983), o que a caracteriza como uma espécie de polinização generalista. A média da

distância de dispersão de pólen encontrado por este trabalho foi de 393 m, com metade da distribuição espacial ocorrendo em distâncias inferiores a 100 m e aproximadamente 14% em distâncias superiores a 1.000 m (Figura 4). Os dados obtidos diferem das estimativas de fluxo de pólen de outros estudos realizados com a *I. paraguariensis*. Wendt et al. (2009), utilizando marcadores isoenzimáticos, estimaram a distância média de fluxo de pólen para um pomar de sementes de *I. paraguariensis* em 15,9 m. Cansian et al. (2010), utilizando marcadores RAPD, encontraram 83% do fluxo de pólen em distâncias inferiores a 20 m em estudos com progênies de *I. paraguariensis*. Uma possível explicação para esta diferença é a amostragem realizada nestes trabalhos, além da diferença ambiental de cada local. Os trabalhos foram conduzidos em plantios de *I. paraguariensis*, com os indivíduos da espécie em alta densidade, e isso pode ter facilitado o deslocamento dos polinizadores em curta distância. Diferentemente, este estudo foi conduzido em populações naturais, com baixa densidade populacional. Estas características podem levar polinizadores a aumentarem a distância de dispersão de pólen para valores superiores a 500 m (DICK et al., 2008). Vários trabalhos com espécies arbóreas tropicais, polinizadas por pequenos insetos, encontram distâncias superiores a 1.000 m para dispersão de pólen (DICK et al., 2008; MANOEL et al., 2012; ROSAS et al., 2011).

Pela análise de parentesco não foi possível detectar fluxo gênico de pólen oriundo de outras populações naturais de *I. paraguariensis*. Os dois locais de estudo encontram-se isolados por uma matriz antrópica composta principalmente por áreas agrícolas e pastagem intensiva. Os resultados sugerem que os polinizadores da *I. paraguariensis*, podem apresentar dificuldade em deslocar-se de outras populações naturais para os dois fragmentos. Não era esperado encontrar fluxo de pólen entre as duas populações, devido à distância que as separam ser alta para uma espécie polinizada por pequenos insetos. Entretanto,

pela proximidade das áreas com o PARNA Iguazu era esperado encontrar alguma migração de pólen de origem externa, apesar da análise de parentesco contemplar apenas parte das amostras das plântulas coletadas. Possíveis efeitos negativos no fluxo de pólen em áreas fragmentadas foram descritos em outros estudos com espécies arbóreas tropicais polinizadas por animais (LLORENS et al., 2012; MANOEL et al., 2012; ROSAS et al., 2011; SEOANE et al., 2005a; 2005b; SEBBENN et al., 2011).

Para estimar a distância de dispersão de sementes e por desconhecer o sexo dos possíveis parentais, foram realizadas duas estimativas para a determinação da suposta árvore doadora de sementes. A primeira estimativa considerou a planta doadora de sementes, o candidato parental localizado mais próximo da posição espacial da plântula. A segunda estimativa considerou o candidato parental localizado mais distante, em relação à posição espacial da plântula, como a árvore doadora de sementes. Com isso, a média da dispersão de sementes pela estimativa mínima foi de 421 m e pela estimativa de dispersão máxima foi de 740 m. As duas estimativas apresentaram resultados semelhantes para as distâncias de dispersão mínima e máxima de sementes (Tabela 6), contudo foram divergentes em relação a frequência da distribuição espacial (Figuras 5 e 6).

Pela estimativa restrita, aproximadamente 64% da dispersão de sementes ocorreu em distâncias inferiores a 100 m e apenas 14% da dispersão em distâncias superiores a 1.000 m (Figura 5). Pela estimativa de dispersão de sementes máxima, 36% da dispersão ocorreu em distâncias inferiores a 100 m e 32% em distâncias acima de 1.000 m (Figura 6).

As duas abordagens mostraram ser muito divergentes em relação à frequência da distribuição espacial. Com isso, ao assumir alguma delas inevitavelmente será subestimado ou superestimado o padrão da dispersão de sementes. Em espécies monoicas e

hermafroditas não é possível determinar o sexo dos parentais em estudos com banco de plântulas estabelecidas, sendo necessário optar por alguma das duas estimativas, apesar do erro associado. Este método de análise vem sendo utilizado na situação onde não é possível distinguir com precisão o sexo dos parentais (DOW; ASHLEY, 1998; NAKANISHI et al., 2006; SEBBENN et al., 2011). Em espécies dioicas como a *I. paraguariensis* é possível diferenciar o sexo pela morfologia da flor ou pela presença de sementes nas plantas femininas. Porém, não foram observados sinais de plantas com flores e frutos nas duas populações durante a etapa de coleta, que contemplou o período de março a setembro de 2011. Embora este período contemple o intervalo de florescimento e frutificação da *I. paraguariensis* descritos na literatura para o Estado do Paraná (CARVALHO, 2003).

Devido à ausência de EGE nas duas populações, é provável que a segunda estimativa consiga relacionar, de forma abrangente, os aspectos relacionados ao padrão de dispersão de sementes com o padrão da distribuição espacial das plântulas e adultos nas duas áreas. A dispersão de pólen foi mais restrita que a dispersão de sementes, em comparação com a estimativa de dispersão de sementes mínima (Tabela 5, Figuras 4 e 5). Em vista disso, é possível observar que o fluxo de pólen é mais restrito que o fluxo de sementes, principalmente considerando a estimativa de dispersão máxima, cuja diferença é mais evidente em relação a dispersão de pólen (Tabela 5, Figura 6).

Apesar da grande interação de *I. paraguariensis* com a avifauna para dispersão de sementes, não foi possível detectar migração. As plântulas analisadas pelo teste de parentesco apresentaram os parentais na própria área de estudo. Entretanto, é necessário cautela com os resultados, pois apenas parte das plântulas coletadas foram analisadas pelo teste de parentesco (Tabela 6). Estudos com espécies arbóreas tropicais sugerem distúrbios na migração de sementes de populações em áreas fragmentadas,

com efeitos negativos pela redução das taxas de migração (SEOANE et al., 2005b), ou ausência de migração de sementes (SEBBENN et al., 2011).

As baixas taxas de divergência genética entre populações naturais de *I. paraguariensis* observadas em outros trabalhos (CANSIAN, 2003; GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; WENDT, 2005; WENDT, et al., 2007) podem estar relacionados com o grande potencial de dispersão de sementes da espécie. Todavia, os resultados obtidos por este trabalho sugerem existir redução da migração de pólen e de sementes para as duas populações de *I. paraguariensis*, devido à fragmentação. Paisagens fragmentadas prejudicam a movimentação de polinizadores e dispersores, devido à barreira gerada pela matriz antropogênica (GHAZOUL, 2005). Com menores níveis de fluxo gênico em paisagens fragmentadas, espécies de plantas elevam as taxas de autofecundação e endogamia (COLLEVATTI et al., 2010), o que promove o aumento da divergência genética entre populações.

#### **6.4. Implicações para conservação**

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

Na comparação entre as duas populações foi encontrada diferenciação genética, que talvez indique certa restrição no fluxo gênico de outras populações naturais de *I. paraguariensis*. Os dois fragmentos pertencem à área de entorno do PARNA Iguaçu, uma das principais unidades de conservação do país e um dos principais remanescentes florestais do Bioma Mata Atlântica. A distância que separa as áreas do Parque é relativamente

pequena, inferior a 4 km, contudo os resultados sugerem que a fragmentação pode estar atuando como uma barreira à dispersão de pólen e de sementes para *I. paraguariensis*, apesar da grande interação da espécie com a fauna.

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

A despeito da importância cultural e econômica do cultivo da *I. paraguariensis* no país, pode ser preocupante o estado de conservação da espécie, por ser uma espécie típica do sub-bosque da Floresta Ombrófila Mista, formação florestal severamente ameaçada do Bioma Mata Atlântica, e pouco protegida em unidades de conservação. Essa situação pode levar a espécie *I. paraguariensis* a um estado crítico de conservação, devido ao alto potencial de erosão genética em que as populações naturais da espécie podem estar expostas. A perda de diversidade genética de *I. paraguariensis* representada por suas populações naturais, além de suas consequências ecológicas e genéticas, pode comprometer programas de melhoramento da espécie em médio e longo prazo, com graves implicações econômicas para a atividade ervateira no Brasil.

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

## 7. Conclusões

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

## 8. Referências

ALMEIDA, A. N.; BITTENCOURT, A. M.; SANTOS, A. J. dos; EISFELD, C. L.; SOUZA, V. S. Production and price evolution of the main extractive non timber forest products in Brazil. **Cerne**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 282-287, 2009.

**ATLAS dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2008-2010.** São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica; INPE, 2011. 120 p.

CANSIAN, R. L. **Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) do Brasil, visando a conservação da espécie.** 2003. 82 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade de São Carlos, São Carlos, SP.

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

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 1039 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**, Berlin, v. 6, n. 4, p. 555-564, 2010.

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

- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, p. 299-306, 2001.
- DICK, C. W.; HARDY, OLIVIER J.; JONES, F. A.; PETIT, R. J. Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 1, p. 20-33, 2008.
- DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Heredity**, London, v. 89, p. 62-70, 1998.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, 11-15, 1987.
- EWERS, R. M.; THORPE, S.; DIDHAM, R. K. Synergistic interactions between edge and area effects in a heavily fragmented landscape. **Ecology**, v. 88, p. 96–106, 2007.
- FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review in Ecology Evolution and Systematics**, v. 34, p. 487–515, 2003.
- FERREIRA, A. G.; KASPARY, R., FERREIRA, H. B.; ROSA, L. M. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Brasil Florestal**, Brasília, DF, n. 53, p. 29-33, 1983.
- GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity**, London, v. 84, n. 6, p. 647-656, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

ICMBIO. **Parque Nacional do Iguaçu**. Disponível em: <[http://www4.icmbio.gov.br/parna\\_iguacu//](http://www4.icmbio.gov.br/parna_iguacu//)>. Acesso em: 30 ago. 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural da Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINARIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: SILVICULTURA DA ERVA-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL.), 10., Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPFF, 1983. p. 28-30.

PEREIRA, M. F.; CIAMPI, A. Y.; INGLIS, P. W.; SOUZA, V. A.; AZEVEDO, V. C. R. Shotgun sequencing for microsatellite identification in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Applications in Plant Sciences**, v. 1, n. 3, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.3732/apps.1200245>.

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

RESENDE, L.; RIBEIRO, R.; LOVATO, M. Diversity and genetic connectivity among populations of a threatened tree (*Dalbergia nigra*) in a recently fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. **Genetica**, Dordrecht, v. 139, n. 9, p. 1159-1168, 2011.

RODRIGUES, R. R.; LIMA, R. A. F.; GANDOLFI, S.; NAVE, A. G. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 142, p.1242–1251, 2009.

ROSAS, F.; QUESADA, M.; LOBO, J. A.; SORK, V. L. Effects of habitat fragmentation on pollen flow and genetic diversity of the endangered tropical tree *Swietenia humilis* (Meliaceae). **Biological Conservation**, Beijing, v. 144, n. 12, p. 3082-3088, 2011.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M. Moraes, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, v. 106, n. 1, p. 134-145, 2011.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M. S.; BAWA, K.; SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Martius.

**Revista do Instituto Florestal**, Piracicaba, v. 17, n. 1, p. 23–43, 2005a.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em duas populações naturais de *Euterpe edulis* M. sob diferentes condições de fragmentação florestal. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 69, p. 13–24, 2005b.

SILVA, M. B.; KANASHIRO, M.; YAMAGUISHI, A. C.; THOMPSON, I., SEBBENN, A. M. Genetic effects of selective logging and pollen gene flow in a low-density population of the dioecious tropical tree *Bagassa guianensis* in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, n. 5–6, p. 1548–1558, 2008.

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

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

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lancaster, v. 38, n. 6, p. 1358–1370, 1984.

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

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

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

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

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

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

ZILLER, S. R. **Avaliação ecológica rápida do Parque Nacional do Iguaçu: diagnóstico ambiental: componente vegetação**. Curitiba: IBAMA/FUPEF, 1998. 67 p.

**Embrapa**

---

**Florestas**

Ministério da  
**Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

CGPE 11081