

FERNANDA BORTOLANZA PEREIRA

**PRÉ-MELHORAMENTO, GENÉTICA QUANTITATIVA E MOLECULAR DE
Roupala montana var. *brasiliensis*: UMA ESPÉCIE POTENCIAL MADEIREIRA
DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA**

Botucatu

2021

FERNANDA BORTOLANZA PEREIRA

**PRÉ-MELHORAMENTO, GENÉTICA QUANTITATIVA E MOLECULAR DE
Roupala montana var. *brasiliensis*: UMA ESPÉCIE POTENCIAL MADEIREIRA
DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ciência Florestal (Silvicultura e Genética Florestal).

Orientador(a): Prof. Dr. Evandro Vagner Tambarussi

Coorientadores: Ph.D. David H. Boshier, Prof. Dr. Celso Luis Marino e Dr. João R. B. F. da Rosa

Botucatu

2021

P436p

Pereira, Fernanda Bortolanza

Pré-melhoramento, genética quantitativa e molecular de *Roupala montana* var. *brasiliensis* : uma espécie potencial madeireira da Floresta Ombrófila Mista / Fernanda Bortolanza Pereira. -- Botucatu, 2021

117 p. : tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientador: Evandro Vagner Tambarussi

Coorientador: Celso Luis Marino; David Boshier; João Ricardo Bachega Feijó Rosa

1. Genética de populações. 2. Paisagens fragmentadas. 3. Marcadores genéticos. 4. Genética vegetal. 5. Genética quantitativa. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PRÉ-MELHORAMENTO, GENÉTICA QUANTITATIVA E MOLECULAR DE *Roupala montana* var. *brasiliensis*: UMA ESPÉCIE POTENCIAL MADEREIRA DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA

AUTORA: FERNANDA BORTOLANZA PEREIRA
ORIENTADOR: EVANDRO VAGNER TAMBARUSSI
COORIENTADOR: JOÃO RICARDO BACHEGA FEIJÓ ROSA
COORIENTADOR: CELSO LUIS MARINO
COORIENTADOR: DAVID H. BOSHIER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA FLORESTAL, pela Comissão Examinadora:

Evandro V. Lauer

Prof. Dr. EVANDRO VAGNER TAMBARUSSI (Participação Virtual)
Engenharia Florestal / Universidade Estadual do Centro-Oeste

P/ *Evandro V. Lauer*

Prof. Dr. MARIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES (Participação Virtual)
Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

P/ *Evandro V. Lauer*

Prof. Dr. EDSON JOSÉ VIDAL DA SILVA (Participação Virtual)
Ciências Florestais / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

P/ *Evandro V. Lauer*

Pesquisador Dr. ALEXANDRE MAGNO SEBBENN (Participação Virtual)
Genética e Melhoramento Florestal / Instituto Florestal de São Paulo

P/ *Evandro V. Lauer*

Pesquisador Dr. MARIA IMACULADA ZUCCHI (Participação Virtual)
/ Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio

Botucatu, 02 de fevereiro de 2021

Aos meus pais, Nelson e Leticia,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, na forma como ele existir, pelos dons da vida e inteligência.

Aos meus pais, Nelson Pereira e Leticia Bortolanza Pereira, por me apoiarem durante toda minha caminhada acadêmica e acreditarem no meu projeto de vida, por todos os sacrifícios feito até hoje para que eu pudesse alçar mais esta conquista. Sem vocês, nada seria possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Evandro Vagner Tambarussi, pela orientação, conselhos, amizade, paciência e zelo com que caminhou ao meu lado nesta jornada chamada doutoramento. Obrigada, Professor Evandro, por sempre acreditar no meu potencial, mesmo quando eu duvidei deste. Obrigada por confiar no meu trabalho e me dar a responsabilidade de estar a frente de um projeto tão bonito. Agradeço, também, por ser este ser humano ímpar e me inspirar a ser uma pessoa melhor todos os dias.

Meu especial agradecimento ao meu coorientador, Prof. Dr. Celso Luis Marino, e ao Dr. Bruno C. Rossini, por me acolherem no Laboratório de Genética Vegetal, terem toda paciência e carinho ao me ensinarem tudo o que eu precisei para desenvolver este trabalho.

Também agradeço imensamente ao Dr. Alexandre Magno Sebbenn, por todo conhecimento repassado, pelas preciosas horas dedicadas às análises dos dados e pela especial preocupação em me ensinar e fazer entender tudo que estávamos realizando.

Aos meus coorientadores, Dr. David Boshier e Dr. João R. B. F. da Rosa pelas contribuições importantes no conteúdo científico deste manuscrito e dos produtos derivados dele.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa, do Laboratório de Melhoramento Florestal da Unicentro, bem como aos colegas membros do Laboratório de Genética Vegetal do IBB-Unesp, pelos momentos de descontração, amizade e apoio. Quero agradecer, em especial, à Ma. Dandara Y. B. de Oliveira Silva, pela sua amizade e parceria. Contem comigo sempre!

Aos meus amados amigos, citando especialmente Renata Buhner e Raquel Rezende, pelos momentos de amizade, apoio, compartilhamento de dores, alegrias e conselhos. Obrigada por existirem e ajudar a tornar mais leve essa caminhada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, especialmente Prof. Dra. Magali Ribeiro e Prof. Dr. Iraê Guerrini, pelos ensinamentos e trabalho em prol da pesquisa florestal brasileira e formação de recursos humanos de alta qualidade.

Aos professores todos que tive o prazer em ser aluna ao longo de toda minha vida como estudante e pós-graduanda, dos quais levo comigo os exemplos, um imenso carinho e respeito. Aos funcionários da Unesp/FCA e da biblioteca da Unesp/FCA, pelo trabalho e dedicação com o qual executam suas atividades, permitindo que possamos trabalhar em nossas pesquisas e laboratórios com tranquilidade e segurança.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro cedido ao Prof. Evandro, Processo 402420/2016-0 via Edital Universal, que viabilizou o trabalho com genética molecular.

Por fim, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, a qual eu agradeço.

RESUMO

A Floresta Ombrófila Mista (FOM) encontra-se fragmentada, restando menos de 1% da área original no Estado do Paraná, Brasil. Sob as copas da sua espécie símbolo, a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze (pinheiro-do-Paraná) ocorrem diversas outras espécies potenciais quase que completamente desconhecidas em diversos aspectos, como a *Roupala montana* var. *brasiliensis* (Klotzsch) K. S. Edwards (Proteaceae). Não endêmica no Brasil, onde é conhecida como carvalho-brasileiro em face à sua madeira de alto valor, foi explorada até sua escassez para substituir *Cardwellia sublimis* F. Muell. (Proteaceae) atendendo ao mercado internacional madeireiro. Quase não há informações sobre aspectos de relevância para conservação, manejo e melhoramento de nenhuma das 34 espécies e variações do gênero *Roupala*. Nossas hipóteses em relação às populações de *R. montana* var. *brasiliensis* localizadas em paisagens distintas da fragmentada Floresta Ombrófila Mista foram: i) a intensa fragmentação da paisagem pode estar afetando a estrutura genética populacional dessas populações, deixando-as menores e ainda mais isoladas; ii) deve estar ocorrendo o aumento do parentesco entre os indivíduos das populações de *R. brasiliensis*, o que levará a depressão endogâmica a longo prazo; iii) devido a autofecundações e cruzamentos correlacionados, sementes coletadas de polinização aberta provavelmente apresentam endogamia e coancestria maior do que a esperada em sementes coletadas de populações panmíticas. Os resultados obtidos a partir das análises realizadas nesta pesquisa confirmaram todas as três hipóteses. A espécie apresenta baixa frequência na floresta e sistema de reprodução preferencialmente por cruzamentos. Há diversidade genética entre populações; entretanto, a evidência de endogamia e a perda de riqueza alélica nos estratos mais jovens, acende um alerta de fragilidade desta diversidade genética. Há estruturação genética significativa nas populações, que se encontram isoladas por distância, mas as taxas de imigração de pólen indicam que não estão isoladas reprodutivamente. Recomenda-se a coleta de sementes de 58 árvores espaçadas no mínimo 300 m entre si, quando visando conservação e diversidade genética. As estimativas do sistema reprodutivo, bem como as longas distâncias de dispersão de pólen indicam uma resistência (efeito tampão) aos efeitos da fragmentação severa e da baixa densidade de indivíduos nas populações de *R. montana* var. *brasiliensis*. A variabilidade genética existente no teste de progênies avaliado permite o início de um programa de pré-

melhoramento; entretanto recomenda-se a busca por um número maior de árvores-matrizes para coleta de sementes e também o estabelecimento de estratégias de enriquecimento das áreas naturais, em função da ausência de imigração via sementes.

Palavras-chave: Florestas conservação. Genética vegetal. Paisagens fragmentadas. Marcadores genéticos. Florestas Reprodução.

ABSTRACT

The Mixed Ombrophilous Forest (FOM) is fragmented, remaining less than 1% of the original area in the State of Paraná, Brazil. Under the canopy of the FOM symbol species, the *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze (Paraná-pine) there are several potential wood species almost completely unknown in several aspects, such as *Roupala montana* var. *brasiliensis* (Klotzsch) K. S. Edwards (Proteaceae). Called as Brazilian-Oak in Brazil, due to its high valued wood, this species was extensively explored in the international market to replace the wood of *Cardwellia sublimis* F. Muell (Proteaceae). There is almost no information on aspects of relevance for the conservation, management and improvement of any of the 34 species and variations of the *Roupala* genus. Our hypotheses regarding the populations of *R. montana* var. *brasiliensis* located in distinct landscapes of the fragmented Mixed Ombrophilous Forest were: i) the intense fragmentation of the landscape may be affecting the population genetic structure, becoming them smaller and more isolated; ii) there must be an increase in the kinship among individuals of *R. montana* var. *brasiliensis* populations, which can lead to inbreeding depression in the long-term; iii) due to the self-fertilization and crossbreeding between relatives, seeds collected from open pollination probably present greater inbreeding and coancestry than expected in samples collected from panmictic samples. The results obtained from the analyzes that we carried out in this research confirmed all three hypotheses. The species has low frequency in the forest and a reproduction system preferably allogamous. There is genetic diversity among populations; however, the observed evidence of inbreeding and loss of allelic richness in the younger strata, ignites a warning about the fragility of this genetic diversity. There is significant genetic structuring in populations, which are isolated by distance, but pollen immigration rates indicate that they are not reproductively isolated. We recommend to collect seeds from 58 trees spaced at least 300 m apart, when aiming at conservation and genetic diversity. Estimates of the reproductive system, as well as the long distances of pollen dispersion, indicate a resistance (buffer effect) to the effects of severe fragmentation and low density of individuals in the populations of *R. montana* var. *brasiliensis*. The genetic variability in the progeny test evaluated allows the start of a pre-breeding program; however, we recommended to search for a larger number of seed-trees to collect seeds and also to

establish strategies to enrich natural areas, due to the absence of immigration via seeds.

Keywords: Forest conservation. Plant genetics. Fragmented landscapes. Genetic markers. Forest reproduction.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 1 - GENÉTICA QUANTITATIVA EM MUDAS DE <i>Roupala montana</i> var. <i>brasiliensis</i> (PROTEACEAE) A PARTIR DE UM TESTE DE PROGÊNIES.....	23
1.1 INTRODUÇÃO	25
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	26
1.2.1 Áreas de coleta de sementes e amostragem	26
1.2.2 Produção das mudas e delineamento experimental do teste de progênies	28
1.2.3 Estimativas dos parâmetros genéticos	29
1.3 RESULTADOS	30
1.4 DISCUSSÃO	32
REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 2 - ISOLATION OF 27 POLYMORPHIC NUCLEAR MICROSATELLITE MARKERS FOR <i>Roupala montana</i> var. <i>brasiliensis</i> (PROTEACEAE).....	39
2.1 INTRODUCTION.....	40
2.2 MATERIAL AND METHODS.....	41
2.3 RESULTS AND DISCUSSION	43
REFERENCES	46
CAPÍTULO - FIRST VALIDATED SET OF MICROSATELLITE LOCI FOR <i>Roupala montana</i> var. <i>brasiliensis</i> (KLOTZSCH) K. S. EDWARDS (PROTEACEAE).....	49
3.1 INTRODUCTION.....	50
3.2 MATERIAL E METHODS	51
3.2.1 Experimental areas and sampling	51
3.2.2 DNA extraction and microsatellite analysis.....	51
3.2.3 Analysis of Mendelian inheritance, genetic and linkage disequilibrium	52
3.3 RESULTS AND DISCUSSION	53
REFERENCES	58
CAPÍTULO 4 - DIVERSIDADE GENÉTICA, SISTEMA REPRODUTIVO E ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL EM POPULAÇÕES NATURAIS DE	

<i>Roupala montana</i> var. <i>brasiliensis</i> (KLOTZSCH) K. S. EDWARDS (PROTEACEAE)	61
4.1 INTRODUÇÃO.....	63
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	64
4.2.1 Áreas experimentais	64
4.2.2 Extração de DNA e análise de microssatélites	67
4.2.3 Análise de diversidade genética	67
4.2.4 Coancestria de grupo e tamanho efetivo de variância	68
4.2.5 Sistema de reprodução.....	68
4.2.6 Estrutura genética espacial.....	69
4.3 RESULTADOS.....	70
4.3.1 Diversidade genética	70
4.3.2 Tamanho efetivo de população.....	72
4.3.3 Sistema reprodutivo	73
4.3.4 Estrutura genética especial (EGE).....	75
4.4 DISCUSSÃO.....	77
4.4.1 Diversidade genética e endogamia.....	77
4.4.2 Sistema reprodutivo	79
4.4.3 Estrutura genética especial (EGE).....	80
REFERÊNCIAS	82
CAPÍTULO 5 - FLUXO GÊNICO CONTEMPORÂNEO E REALIZADO E OCORRÊNCIA DE DEPRESSÃO POR ENDOGAMIA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Roupala montana</i> var. <i>brasiliensis</i> (KLOTZSCH) K. S. EDWARDS (PROTEACEAE).....	87
5.1 INTRODUÇÃO.....	89
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	91
5.2.1 Áreas experimentais	91
5.2.2 Extração de DNA e análise de microssatélites	93
5.2.3 Testes de paternidade	93
5.2.4 Sistema de reprodução e depressão por endogamia	94
5.2.5 Análise de parentesco	95
5.3 RESULTADOS.....	96
5.3.1 Sistema de reprodução baseado no teste de paternidade e depressão por endogamia	96

5.3.2 Fluxo gênico contemporâneo e dispersão de pólen	98
4.3.3 Fluxo gênico realizado e dispersão de sementes e pólen	100
5.4 DISCUSSÃO	104
5.4.1 Sistema reprodutivo e depressão por endogamia	104
5.4.2 Fluxo gênico: sementes.....	106
5.4.3 Fluxo gênico: pólen	106
REFERÊNCIAS.....	109
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
REFERÊNCIAS	115

INTRODUÇÃO GERAL

Intercalada com áreas de savana e estepe, a Floresta Ombrófila Mista (FOM), dá origem a um sistema em mosaico que caracteriza parte da paisagem da Região Sul do Brasil (BACKES, 2001; FIGUEIREDO FILHO et al., 2010). É um ecossistema caracterizado pela presença da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze, popularmente conhecida como araucária ou pinheiro-do-Paraná, que tende a formar uma cobertura contínua dando efeito de uma floresta uniestratificada. Entretanto, sob as copas das araucárias, encontram-se outras espécies de árvores, arbustos, ervas, epífitas e lianas, variando em abundância e porte de acordo com o local e o estágio da comunidade em questão (SONEGO et al., 2007), potencialmente interessantes por suas características, sejam madeireiras ou não.

A FOM foi alvo de acentuada e predatória exploração madeireira, o que a deixou numa situação extremamente crítica, com muitas áreas hoje dando lugar a pastagens e reflorestamentos com espécies exóticas (MEDEIROS, 2006). Os remanescentes ainda existentes, muitos deles profundamente alterados, podem ser encontrados em locais de difícil acesso, em áreas particulares ou nas poucas Unidades de Conservação existentes (SONEGO et al., 2007), como as Florestas Nacionais (FLONA). Soma-se a essa situação o fato de que ações meramente repressivas e estratégias coercitivas não têm se mostrado eficientes quanto o objetivo de preservar os remanescentes florestais no País, imprimindo então o desafio de se criar estratégias que conciliem a conservação e preservação ambiental ao desenvolvimento econômico e social (PIRES et al., 2012).

Nesse contexto, projetos como o então intitulado “Estratégias para o manejo florestal sustentável em pequenas propriedades rurais no Centro-Sul do Paraná, Brasil”, conhecido como projeto “Imbituvão”, originado de uma cooperação técnica-financeira entre os Estados do Paraná, Brasil, e de Baden-Württemberg, Alemanha, por meio das Secretarias do Estado da Ciência e Tecnologia e Ensino Superior (SETI) e do Ministério para Ciência, Pesquisa e Artes de Baden-Württemberg, são importantes e nos permitem entender que efeito os remanescentes de FOM sobre a estrutura e diversidade genética de diferentes espécies com potencial de uso madeireiro, como é o caso da *Roupala montana* var. *brasiliensis* (Klotzsch) K. S. Edwards (Proteaceae).

Ocorrendo sob as copas das araucárias, principalmente em encostas úmidas e em pequenas depressões desde o sul do Estado da Bahia até o Estado de Santa Catarina (REGO, 2009), a *R. montana* var. *brasiliensis* é conhecida popularmente como carvalho-brasileiro, carvalho-da-serra, cedro-bordado e cigarreira (CARVALHO, 2003). É uma espécie semi-caducifólia, com árvores que podem chegar a alturas de 20 a 30 m e diâmetro à altura do peito (DAP) variando de 30 cm a 100 cm (BOERGER et al., 2006; REGO, 2009). Seu cerne é róseo-arroxeadado a róseo-acastanhado, caracterizado por longos raios, superfície lustrosa, brilhante nas faces radiais, possui textura grossa, grã ondulada; com cheiro e sabor imperceptíveis (REGO, 2009). Apresenta porte arbustivo no cerrado e em florestas de galerias, possuindo regeneração natural em florestas secundárias (GONZALEZ et al., 2004). Hermafrodita, segundo a literatura, os períodos de floração e frutificação podem variar com a região, ocorrendo o florescimento em São Paulo e Minas Gerais entre junho e agosto, enquanto o amadurecimento dos frutos se dá do final de agosto até outubro (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2008; CAMPOS FILHO; SARTORELLI, 2015), padrão este observado para populações estudadas nos Estados do Paraná e Santa Catarina.

O carvalho-brasileiro pode ser utilizado na fabricação de móveis e objetos de adornos, na construção civil e naval, vigamento, obras de talha, forros, caixilhos, marcenaria e carpintaria em geral, artesanatos e lâminas faqueadas entre outros. Pode ser utilizado em paisagismos devido suas qualidades ornamentais. Sua madeira é considerada pesada (densidade de $1,08 \text{ g cm}^{-3}$), dura, moderadamente resistente sendo muito durável em ambientes secos ou imersos em água salgada (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2008).

Com muito pouco elucidado sobre a espécie na literatura, pode-se encontrá-la classificada como uma espécie secundária inicial (DURIGAN; NOGUEIRA, 1990), secundária tardia (LONGHI, 1995; NAVE et al., 1997), ou clímax exigente em luz (PINTO, 1997), e ocorre em baixa frequência na floresta. Cubas (2011), em um estudo de florística, estrutura e dinâmica em uma FOM no norte do Estado de Santa Catarina, constatou 12 indivíduos em 26 hectares, apresentando assim uma densidade absoluta de $0,46 \text{ árvores ha}^{-1}$, com um incremento médio periódico anual em DAP de $0,13 \text{ cm ano}^{-1}$. O entendimento da distribuição espacial das plantas dentro de uma população é essencial uma vez que pode influenciar o sistema de reprodução, e, em função da dispersão de pólen e sementes, pode desempenhar grande efeito na estrutura genética espacial e variabilidade genética da espécie (TAMBARUSSI et al., 2015).

Além disso, a estrutura genética espacial intra-populacional também é influenciada por processos microevolutivos e demográficos em curto e longo prazo (EPPERSON, 2003), nos quais podemos inserir os de origem antropogênica, como desmatamento, exploração seletiva, expansão urbana e das fronteiras agrícolas, entre outros.

A fragmentação florestal e o manejo reduzem o tamanho e aumentam a distância entre populações e/ou indivíduos dentro das populações (YOUNG et al., 2001; LACERDA et al., 2013). Esse processo resulta na perda de alelos, reduz a heterozigosidade, isola reprodutivamente populações, portanto, reduz o fluxo gênico, aumentando a endogamia, diferenciação genética entre populações e reduzindo o tamanho efetivo das populações (FRANKHAN, 2012). Influencia também na estrutura espacial e variabilidade genética de populações de plantas intervindo no sistema reprodutivo, por meio da dispersão de pólen e sementes (EPPERSON, 2003). Dessa forma, a estrutura genética de uma população florestal está diretamente relacionada ao sistema de reprodução, aos padrões de imigração de pólen e de sementes que ocorrem dentro e entre populações, à distribuição espacial dos indivíduos e a fatores evolutivos (LOVELESS; HAMRICK, 1984; DEFAVARI et al., 2009), que podem ser alterados pelo manejo da espécie ou mesmo de outras espécies já que a floresta é modificada (LACERDA et al., 2013).

Nesse contexto, a conservação *ex situ* tem sido adotada como uma estratégia para preservar populações de espécies da extinção, sendo fundamental recombinar essa estratégia de conservação e expandi-la por meio de reflorestamentos, garantindo maior conservação das espécies (SEBBENN et al., 2007; TAMBARUSSI et al., 2015). Além disso, é fundamental fornecer subsídios para o uso sustentável, manejo dos recursos madeireiros e não madeireiros dessas espécies, melhoramento genético, bem como inclusão da espécie em programas de recomposição da paisagem, o que pode ser feito pelo acesso às informações genéticas das populações, permitindo direcionar e aperfeiçoar o manejo e a coleta de sementes (DEGEN; SEBBENN, 2014; TAMBARUSSI et al., 2015). O melhoramento genético de espécies florestais depende do conhecimento prévio de mecanismos genéticos responsáveis pela herança de caráter que se deseja melhorar e correlações genéticas com outros caracteres (RESENDE, 2002).

Estudos relacionados a determinação da estrutura genética entre e dentro das populações, esclarecimento dos padrões de fluxo gênico, dispersão de sementes e parentesco entre os indivíduos das populações, são viabilizados por técnicas

moleculares, como os marcadores microssatélites (CAVERS et al., 2005). Os marcadores moleculares se configuram como ferramentas poderosas nos estudos de impacto do manejo em populações naturais, pois ajudam a construir os conhecimentos básicos em relação às espécies de maneira rápida, precisa e com baixo custo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores microssatélites ou Sequencias Simples Repetitivas (SSR) são marcadores largamente utilizados para a análise genética em seres vivos em geral, devido seu alto conteúdo de informações e transferibilidade (SELKOE; TOONEN, 2006). Em espécies florestais os marcadores microssatélites são os mais utilizados e indicados para a maioria das aplicações que envolvam testes de paternidade, sistema de reprodução e diversidade genética (GRATTAPAGLIA, 2014).

Entre as características que fazem com que os microssatélites sejam de fácil utilização e grande informação são: herança codominante; multialelismo, que confere uma elevada capacidade de discriminar indivíduos geneticamente distintos mesmo em situações de forte parentesco, ou, alternativamente declarar que dois indivíduos são geneticamente indistinguíveis com elevada probabilidade; abundância e distribuição uniforme no genoma (GRATTAPAGLIA, 2014).

Desta forma, as informações moleculares podem auxiliar no aumento da eficiência dos processos de coleta, direcionamento do enriquecimento da base genética, explorar a diversidade e pureza genética, assessorar os trabalhos de identificação botânica, contribuir na seleção de árvores matrizes para o melhoramento (pela estimativa do parentesco entre os indivíduos), além de permitir o planejamento dos cruzamentos e a seleção de genótipos com características desejadas em um programa de melhoramento (FALEIRO, 2007).

Com isto posto, fica claro que compreender os aspectos genéticos da fragmentação florestal para a conservação e gestão dos recursos genéticos florestais é essencial. Este estudo objetivou gerar informações valiosas para populações naturais e plantadas de *R. montana* var. *brasiliensis*, em áreas de FOM, cujo *status* de conservação não foi determinado até a presente data, contribuindo ainda para o entendimento do fluxo ancestral e atual de genes, alterações no tamanho efetivo, sistema de reprodução e diversidade genética das espécies em áreas fragmentadas. Com tal entendimento, pode-se propor estratégias para o manejo adequado para conservação da espécie, bem como coleta de sementes, que ocorrerá de forma mais precisa, e assim dando início a programas de melhoramento florestal, conservação

genética e recuperação ambiental, empregando-se os marcadores microssatélites para tais estimativas.

Nossas hipóteses em relação às populações de *R. montana* var. *brasiliensis* localizadas em áreas de unidades de conservação (FLONAS) e em fragmentos de Floresta Ombrófila Mista foram:

- a) como a espécie é considerada de baixa densidade (rara), a intensa fragmentação da paisagem afeta a estrutura genética populacional dessas populações, deixando-as menores e ainda mais isoladas;
- b) o parentesco entre os indivíduos das populações de *R. montana* var. *brasiliensis* é maior do que o esperado, o que levará a depressão endogâmica a longo prazo;
- c) devido a autofecundações e cruzamentos entre parentes, sementes coletadas de polinização aberta apresentam endogamia e coancestria maior do que a esperada em sementes coletadas de populações panmíticas.

CAPÍTULO 1

GENÉTICA QUANTITATIVA EM MUDAS DE *Roupala montana* var. *brasiliensis* (PROTEACEAE) A PARTIR DE UM TESTE DE PROGÊNIES

Resumo

A *Roupala montana* var. *brasiliensis* é uma espécie potencial madeireira que foi extensivamente explorada e não se conhece o status atual da conservação de suas populações naturais. Dado que o melhoramento genético de espécies nativas se apresenta como uma alternativa interessante para a conservação das mesmas, a presente pesquisa teve como objetivo estimar parâmetros genéticos quantitativos na fase de viveiro em mudas de *R. montana* var. *brasiliensis*, a partir de um teste de progênies. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com três blocos e um número variável de plantas/parcelas (de três a 20 mudas). No total, foram utilizados 201 mudas para sete tratamentos (progênies). Os caracteres avaliados aos 60, 120 e 180 dias foram o Diâmetro do colo (DC) e altura (ALT). As herdabilidades no sentido restrito (\hat{h}_a^2) foram consideradas baixas para altura (variando de 0,002 a 0,13 aos 120 e 60 dias, respectivamente) e altas (variando de 0,31 a 0,60 os 180 e 60 dias, respectivamente) para DC. Os coeficientes de variação ambiental ($CV_e\%$) variaram de 43,21% (DC aos 180 dias) a 57,14% (ALT aos 180 dias), sendo considerados altos, indicando grande influência do ambiente. A divergência genética entre procedências foi considerada baixa (variando de 5×10^{-4} para altura aos 120 dias a 0,13 para DC aos 60 dias). Os resultados indicam existência de variabilidade genética entre e dentro de progênies o que pode viabilizar o melhoramento e a conservação genética da espécie. O teste de progênies foi implantado e conduzido no *Campus Irati* da UNICENTRO, para estudos futuros.

Palavras-chave: Altura. Características de crescimento. Diâmetro de colo. Herdabilidade. Variância genética.

Abstract

The *Roupala montana* var. *brasiliensis* is a potential wood species that has been extensively explored and the current conservation status of its natural populations is unknown. Once the genetic breeding of native tree species presents itself as an interesting alternative for their conservation, the present research aimed to estimate quantitative genetic parameters in the nursery phase in *R. montana* var. *brasiliensis*, from a progeny test. The experimental design used was randomized blocks, with three blocks and a variable number of plants/plots (from three to 20 seedlings). In total, 201 seedlings were used for seven treatments (progenies). The diameter (DC) and height (ALT) were evaluated at 60, 120 and 180 days. Heritabilities in the narrow sense (\hat{h}_a^2) were considered low for height (ranging from 0.002 to 0.13 at 120 and 60 days, respectively) and high (ranging from 0.31 to 0.60 at 180 and 60 days, respectively) for DC. The coefficients of environmental variation ranged from 43.21% (DC at 180 days) to 57.14% (ALT at 180 days), being considered high, indicating a great influence of the environment. The genetic divergence between provenances was considered low (ranging from 5×10^{-4} for ALT at 120 days to 0,13 for DC at 60 days). The results indicate the existence of genetic variability among and within progenies, which can enable the improvement and genetic conservation of the species. The progeny test will be implemented and conducted at UNICENTRO's Irati *Campus*, for future studies.

Key-words: diameter; genetic variance; growth characteristics; height; heritability.

1.1 INTRODUÇÃO

A fragmentação florestal possui consequências como a redução da diversidade genética, do tamanho populacional e da variabilidade genética das populações, bem como das funções ecológicas das mesmas, podendo em longo prazo levar à extinção das espécies (SEBBENN et al., 2000; HADDAD et al., 2015), pelo isolamento reprodutivo das mesmas, consequentemente levando endogamia por cruzamentos aparentados e/ou autofecundação, reduzindo a resiliência adaptativa dos indivíduos (YOUNG et al., 2001).

No Estado do Paraná, a Floresta Ombrófila Mista era a organização vegetal principal, cobrindo originalmente cerca de 37% da área total do Estado (MAACK, 1981). Atualmente, apenas cerca de 0,7% da FOM se aproxima em diversidade e estrutura da floresta original (FUPEF, 2001; MEDEIROS et al., 2005).

Dentre as espécies que ocorrem sob as copas das *A. angustifolia*, árvore símbolo da FOM, está a *R. montana* var. *brasiliensis*, conhecida como carvalho-nacional-brasiliense, devido sua madeira de elevada qualidade (REGO, 2009). De ocorrência ampla na América Latina, (CARVALHO, 2003), substituiu no mercado internacional a madeira de *Cardwellia sublimis* quando esta se tornou escassa na Austrália, e atualmente, foi substituída por *P. rubescens*, de maior disponibilidade (WORLD TIMBERS INC., 2020), o que ilustra a exploração predatória e irracional de *R. montana* var. *brasiliensis*.

Comparado ao carvalho-europeu (*Quercus robur* L.), devido sua madeira de boa qualidade e densa (MAINIERI, 1973; CARVALHO, 2003), é recomendado para construção de móveis, objetos de adorno, construção civil e naval (CARVALHO, 2003), além de produzir lenha e carvão de boa qualidade (PAULA; ALVES, 1997). Também é recomendada para plantios de recuperação de ecossistemas degradados e reposição de mata ciliar em locais onde não ocorrem inundações (CARVALHO, 2003).

Num contexto de habitats altamente fragmentados, o melhoramento de espécies nativas pode representar uma forma de preservá-las (SHIMIZU, 2007). A diferença entre o melhoramento genético de novas espécies nativas e o melhoramento genético em espécies convencionais reside na necessidade das etapas do pré-melhoramento para conhecer o material que se está trabalhando, uma vez que estas espécies não sofreram nenhum processo de melhoramento e, portanto, não

possuem identificação de genes de interesse em germoplasma (NASS; PATERNIANI, 2000). Deste modo, o pré-melhoramento contribui para a formação de uma base genética conhecida para possível obtenção de ganhos genéticos em programas de melhoramento (DUVICK, 1990), bem como para o manejo florestal, visto que a geração de informações sobre a saúde genética das populações naturais permite a tomada de decisões visando a manutenção da espécie na paisagem.

Apesar de existirem alguns exemplos de programas de melhoramento genético em espécies nativas estabelecidos, desde objetivando a produção de madeira, fibra celulósica e sementes/frutos/castanhas, como em *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Castanha-do-Brasil) (WADT; KAINER, 2009), *Didymopanax morototom* (Morototó) (KANASHIRO, 1992), *A. angustifolia* (REITZ; KLEIN, 1996; SOUZA; AGUIAR, 2012) e em *Euterpe oleracea* (Açaizeiro) (OLIVEIRA, 2009), podemos considerar como escassos os estudos com espécies nativas de potencial madeireiro ou não-madeireiro, se comparados ao número de espécies ainda existente.

Assim, tendo em vista o potencial madeireiro de *R. montana* var. *brasiliensis*, associado ao risco que a espécie pode estar sofrendo em função do habitat fragmentado, o desenvolvimento de um programa de melhoramento da espécie visando viabilizar a exploração comercial da mesma viável pode se apresentar como uma alternativa para sua conservação. Para tanto, o presente capítulo visa apresentar as avaliações na fase de viveiro de um teste de progênies de *R. montana* var. *brasiliensis* para obtenção da variação genética a partir de características de crescimento, bem como delimitar os primeiros *insights* sobre as populações estudadas.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Áreas de coleta de sementes e amostragem

A presente pesquisa contou com o apoio da equipe do projeto de manejo florestal denominado “Estratégias para o manejo florestal sustentável em pequenas propriedades rurais no centro-sul do Paraná, Brasil”, conhecido como projeto “Imbituvão”, e que faz parte de uma cooperação técnica-financeira entre os Estados do Paraná e de Baden-Württemberg (Alemanha) por meio das Secretarias do Estado

da Ciência e Tecnologia e Ensino Superior (SETI) e do Ministério para Ciência, Pesquisa e Artes de BadenWürttemberg.

Por dois anos consecutivos (2017-2018), quatro populações (Tabela 1) tiveram o desenvolvimento das fases fenológicas acompanhados, para obtenção das sementes e consequente composição do teste de progênies. No segundo ano de observação, 2018, duas áreas de coleta localizadas no município de Fernandes Pinheiro, Estado do Paraná, apresentaram produção de sementes: a Floresta Nacional de Irati (FLONA-Irati), com 14 indivíduos adultos, e remanescentes florestais em propriedades rurais familiares participantes do projeto “Imbituvão”, onde observou-se oito indivíduos adultos. As outras duas populações, uma localizada na Floresta Nacional de Três Barras (TB), no município de Três Barras, Estado de Santa Catarina, e outra localizada no bosque do Centro Estadual Florestal de Educação Profissional Presidente Costa e Silva (CF), município de Irati, Estado do Paraná, não apresentaram produção de flores e frutos no evento reprodutivo considerado para este estudo.

Tabela 1 – Populações de *Roupala montana var. brasiliensis* localizadas em áreas de Floresta Ombrófila Mista cuja fenologia reprodutiva foi acompanhada durante os anos de 2017 e 2018 para coleta de sementes

População	Indivíduos adultos (<i>N</i>)	Coordenadas centrais		Localização
		Latitude	Longitude	
FLONA-Irati	14	25° 23' 14" S	50° 34' 45" O	Fernandes Pinheiro, Paraná
“Imbituvão” ¹	8	25° 31' 20" S	50° 33' 30" O	Fernandes Pinheiro, Paraná
Colégio Florestal ²	8	25° 30' 20" S	50° 38' 00" O	Irati, Paraná
FLONA-Três Barras	5	26° 12' 30" S	50° 17' 30" O	Três Barras, Santa Catarina

¹ Áreas de reserva legal e área de proteção permanente das propriedades rurais familiares que compõem o “Estratégias para o manejo florestal sustentável em pequenas propriedades rurais no Centro-Sul do Paraná, Brasil”. ² Bosque florestal localizado no Centro Estadual Florestal de Educação Profissional Presidente Costa e Silva.

Os frutos foram coletados de acordo com o recomendado por Carvalho (2003), cujo ponto de coleta é quando estes passam da coloração esverdeada e consistência carnosa para castanho-parda ou castanho-esverdeada e consistência lenhosa-coriácea, no início do processo de deiscência e disseminação das sementes. As coletas, via escalada das matrizes com auxílio de podão, foram realizadas durante os

meses de novembro e dezembro de 2018. No total, foram coletados frutos de quatro matrizes da FLONA-Irati e quatro matrizes das áreas do projeto “Imbituvão”, o que equivaleu a todas as árvores que produziram frutos. Os frutos coletados foram levados para o Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal da UNICENTRO e acondicionados em temperatura ambiente ao ar livre para finalizar o processo de deiscência e obtenção das sementes.

1.2.2 Produção das mudas e delineamento experimental do teste de progênies

Para a produção das mudas, foram utilizados tubetes grandes (280 cm³), preenchidos com substrato comercial Carolina Soil ®. Para germinação, os tubetes foram acondicionados em casa de vegetação no viveiro florestal da UNICENTRO. À medida que iam germinando, as plântulas foram movidas para a casa de sombra, até o momento da montagem do experimento; este processo ocorreu durante os meses de dezembro de 2018 e janeiro de 2019. Após a implantação do experimento foram feitas duas aplicações de N-P-K (28-14-14), com um período de um mês entre cada aplicação, para promoção do crescimento foliar das plântulas.

Após a germinação das plântulas, estas foram dispostas em um delineamento experimental em blocos ao acaso, com três blocos, sete tratamentos (progênies), com número variável de plantas por parcela (três a 20 mudas). De uma das matrizes da FLONA-Irati, apenas três sementes germinaram, de modo que ela foi desconsiderada na montagem do teste de progênies. O total de mudas no experimento foram de 201. O desbalanceamento entre os tratamentos foi em função da diferença no número de frutos que cada matriz produziu.

As avaliações de diâmetro de colo e altura, em milímetros, foram feitas após 60, 120 e 180 dias após implantação do experimento, com auxílio de um paquímetro digital (*Carbon Fiber Composites Digital Caliper*), com precisão de três casas decimais. A partir destas avaliações foi possível estimar os parâmetros genéticos dos indivíduos do experimento.

1.2.3 Estimativas dos parâmetros genéticos

Após a coleta dos dados, foram feitas as estimativas dos parâmetros genéticos em ambiente R (R CORE TEAM, 2018), com auxílio do pacote estatístico *lme4* (BATES et al., 2015).

Os parâmetros estimados foram a variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$), variância ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$), variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$), herdabilidade no sentido restrito ($\hat{h}_a^2 = \frac{4\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_f^2}$), herdabilidade dentro das parcelas ($h_d^2 = \frac{3\sigma_p^2}{\sigma_d^2}$), herdabilidade média ($\hat{h}_m^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_f^2 + \frac{\sigma_e^2}{J} + \frac{\sigma_d^2}{JK}}$, em que J é

o número médio de repetições e K é o número médio de plantas por parcela),

coeficiente de variação genética ($CV_g(\%) = \frac{\sqrt{\sigma_g^2}}{\bar{m}} \cdot 100$), coeficiente de variação

ambiental ($CV_e(\%) = \frac{\sqrt{\sigma_e^2}}{\bar{m}} \cdot 100$), coeficiente de variação genética aditiva individual(

$CV_{gi}(\%) = \frac{\sqrt{4\sigma_g^2}}{\bar{m}} \cdot 100$), o desvio padrão herdabilidade no sentido restrito ($\hat{s}(\hat{h}_a^2) = \sqrt{\frac{32h_a^2}{nbp}}$

, em que nbp é o número total de plantas avaliadas), a diferenciação genética das

populações segundo Sebbenn et al. (2004) ($\hat{Q}_{ST} = \frac{\hat{\sigma}_p^2}{\hat{\sigma}_p^2 + \hat{\sigma}_e^2 + \hat{\sigma}_d^2}$), as correlações

genéticas entre os caracteres avaliados a nível de plantas individuais (

$\hat{r}_g = \frac{\hat{\sigma}_{p_x p_y}}{\sqrt{\hat{\sigma}_{p_x}^2 \hat{\sigma}_{p_y}^2}}$, em que $\sigma_{p_x p_y}$ é o produto genético cruzado dos caracteres x e y ,

$\sigma_{p_x}^2$ e $\sigma_{p_y}^2$ são as variâncias genéticas entre procedências para os caracteres x e y , respectivamente).

No entanto, visando corrigir o efeito de sistema reprodutivo nas estimativas e, partindo-se do pressuposto de sistema misto de reprodução para a espécie em função das suas estruturas florais, as herdabilidades foram estimadas como

$h_i^2 = \frac{\sigma_p^2 / 2\bar{\theta}}{\sigma_p^2 + \sigma_e^2 + \sigma_d^2}$ (individual) e $h_d^2 = \frac{(1-2\bar{\theta})\sigma_A^2}{\sigma_d^2}$ onde, $\bar{\theta} = 0,18$ é o coeficiente de

médio de coancestria de Loiselle et al. (1995) para dados moleculares de 27 marcadores microssatélites para 34 adultos de todas as populações, utilizando o programa Spagedi (HARDY; VEKEMANS, 2002).

1.3 RESULTADOS

Os parâmetros genéticos estimados (Tabela 2) indicam que a componente ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$) da variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$) foi a que apresentou maior contribuição para ambos os caracteres em todas as avaliações. A diferença observada entre as estimativas da herdabilidade no sentido restrito obtidas diretamente dos dados e aquela corrigida para o sistema de reprodução, considerando o coeficiente médio de coancestria, variaram de 50% a 84,61%, para altura aos 120 dias e 60 dias, respectivamente. Para herdabilidade dentro, esta diferença foi acima de 100% para todas as estimativas, variando de 112,12% a 200%, também para altura, aos 180 e 120 dias, respectivamente.

Segundo a classificação de Resende (1995), aos 60 dias, a herdabilidade no sentido restrito (\hat{h}_a^2) e a herdabilidade média (\hat{h}_m^2), corrigidas para o sistema de reprodução, foram considerados altas (0,59 e 0,88, respectivamente) para o caractere diâmetro de colo, e baixa (0,13) e alta (0,58), respectivamente para altura, enquanto para a herdabilidade entre parcelas (\hat{h}_d^2) foi considerada mediana (0,45) e baixa (0,08) para diâmetro de colo e altura, respectivamente. Aos 120 dias, para diâmetro de colo obteve \hat{h}_a^2 e \hat{h}_d^2 foram medianas (0,49 e 0,35), enquanto a \hat{h}_m^2 foi considerada alta (0,84). Para altura aos 120 dias, todas as herdabilidades foram consideradas baixas (0,002; 0,001 e 0,02). Para a última avaliação, realizada aos 180 dias, os valores de \hat{h}_a^2 e \hat{h}_d^2 foram consideradas medianas (0,43 e 0,31) para diâmetro de colo e baixos (0,057 e 0,033) para altura, enquanto \hat{h}_m^2 foi considerada alta para ambas as características.

Os $CV_e(\%)$ variaram de 43,20% a 57,14%, enquanto o coeficiente de variação genético ($CV_g(\%)$), variou de 9,29% a 27,26%, para ambos os caracteres. Para coeficiente de variação genética aditiva individual ($CV_{gi}(\%)$), foram obtidos valores entre 2,70 e 41,78%.

Tabela 2 – Parâmetros genéticos estimados para mudas seminais de *Roupala montana* var. *brasiliensis* de duas populações, FONA-Irati e Imbituvão, estimados aos 60, 120 e 180 dias após o estabelecimento do teste de progênes, para diâmetro de colo (DC) e altura (H), em mm

Parâmetros genéticos	Idade das mudas/caracteres					
	60 dias		120 dias		180 dias	
	DC (mm)	H (mm)	DC (mm)	H (mm)	DC (mm)	H (mm)
Variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$)	6,82	152,16	9,29	1,53	8,49	33,60
Variância ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$)	19,25	2331,49	33,04	1467,10	33,95	1285,78
Variância genética entre parcelas ($\hat{\sigma}_p^2$)	2,64x10 ⁻⁷	0	0,60	0	2,32	0
Variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$)	26,08	2483,66	42,95	1468,64	44,76	1319,4
Coeficiente de variação genética (CV_g (%))	27,71	13,85	20,04	1,79	21,60	9,23
Coeficiente de variação genética aditiva individual (CV_{gi} (%))	41,78	20,89	30,21	2,7	32,57	13,92
Coeficiente de variação ambiental (CV_e (%))	46,54	54,24	37,79	55,33	43,20	57,14
Herdabilidade no sentido restrito ($\hat{h}_a^2 \pm \hat{s}(\hat{h}_a^2)$)	1,04±0,31	0,24±0,15	0,86±0,32	0,004±0,02	0,75±0,31	0,10±0,11
Herdabilidade no sentido restrito corrigido ($\hat{h}_a^2 \pm \hat{s}(\hat{h}_a^2)$)	0,59±0,31	0,13±0,15	0,49±0,32	0,002±0,02	0,43±0,31	0,06±0,11
Herdabilidade dentro das parcelas (\hat{h}_d^2)	1,06	0,19	0,84	0,003	0,75	0,07
Herdabilidade dentro das parcelas corrigido (\hat{h}_d^2)	0,45	0,08	0,35	0,001	0,31	0,033
Herdabilidade média (\hat{h}_m^2)	0,88	0,58	0,84	0,02	0,78	0,36
Divergência genética entre procedências (\hat{Q}_{ST})	0,13	0,03	0,10	5x10 ⁻⁴	0,09	0,01
Correlação genética	45,28		41,08		41,95	
Média	9,42	59,01	14,30	69,21	13,48	62,74

A estima de divergência genética entre procedências (\hat{Q}_{ST}) variaram de 0,09 a 0,13 para diâmetro de colo, enquanto que para altura, a variação foi entre 0,01 e 0,03, reduzindo conforme as mudas foram se desenvolvendo. As correlações genéticas estimadas entre os caracteres estudados resultaram em 45,28%, 41,08% e 41,95%, aos 60, 120 e 180 dias, respectivamente.

1.4 DISCUSSÃO

O efeito da correção para sistema reprodutivo nas herdabilidades evita superestimativas, como as observada de até 200% no valor observado, e valores de \hat{h}^2 acima da unidade, que não possuem sentido biológico dado que este parâmetro varia de 0 a 1, reiterando a necessidade e importância já ilustrada na literatura de se estudar o sistema reprodutivo em espécies dentro de programas melhoramento e/ou conservação genética (TAMBARUSSI et al., 2018).

Em relação aos valores de herdabilidades observados para *R. montana* var. *brasiliensis*, estudos conduzidos com outras espécies florestais nativas corroboram com o comportamento de alterações nos valores em função do aumento da idade para caracteres quantitativos em plantas, sendo tais variações mesmo em intervalos curtos de tempo (60 dias), comuns e esperadas, e podendo ser atribuídas ao aumento na competição entre plantas ou pela redução relativa do espaço. Em Ipê-Amarelo (*Tabebuia chrysotricha* Standl) aos 90 dias de idade em viveiro, para altura a \hat{h}_m^2 foi de 0,84 (COSTA et al., 2007), valor similar ao observado no presente estudo. Em *Jacaranada cuspidifolia*. Vell, conhecido popularmente como jacarandá-caroba, os valores de \hat{h}_m^2 foram de 0,72 e 0,48 para diâmetro de colo e de 0,54 e 0,53 para altura aos 12 e 24 meses de idade, respectivamente (MORAES, 2013). Menegatti et al. (2016) estudando bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) aos 12 meses de idade em quatro locais, obtiveram valores de herdabilidade no sentido restrito (\hat{h}_a^2) para diâmetro do colo em torno de 0,53, similar aos valores observados em carvalho-brasileiro.

Em relação aos valores de $CV_e(\%)$ observados para *R. montana* var. *brasiliensis* (43,20% - 57,14%), Canuto et al. (2015) observou faixa similar para altura

aos 12 meses (39,86% - 52,36%) em mudas de baru (*Dipteryx alata Vogel.*), também classificados como muito altos (>30%) segundo Gomes (2000), o que indica o alto controle do ambiente para este caractere, resultado que pode ser atribuído a pouca idade das mudas, além de sua origem seminal. O $CV_e(\%)$ tende a diminuir após a estabilização dessas mudas no ambiente (LEDO et al., 2003), principalmente para altura.

De acordo com Sebbenn et al. (1997), valores de $CV_g(\%)$ acima de 7% são altos para espécies perenes, indicando existência de variabilidade genética nas progênes e populações estudadas. Assim, apesar do elevado coeficiente de variação ambiental, o coeficiente de variação genético ($CV_g(\%)$), para todas as avaliações, também foi considerado alto (9,29% a 27,26%), para ambos os caracteres, exceto para altura na segunda avaliação, onde foi baixo (1,79%), indicando variabilidade genética promissora nas progênes e procedências estudadas. Corroborando com este resultado, os valores do coeficiente de variação genética aditiva individual ($CV_{gi}(\%)$) também indicam que a variabilidade genética existente pode ser manejada a fim de buscar ganhos genéticos.

Avaliar a divergência genética entre progênes e procedências distintas a partir de estudos de genética quantitativa é uma etapa fundamental em programas de melhoramento genético, por permitir um direcionamento mais acurado da estratégia a ser adotada, bem como explorar cruzamentos e recombinações entre populações e indivíduos via hibridação, por exemplo, e ampliar a base genética disponível para geração de ganhos genéticos (SEBBENN et al., 2003; SILVA et al., 2012). Os valores observados para *R. montana var. brasiliensis* foram muito baixos. Contudo, avaliações em idade precoce para obtenção da estimativa da divergência genética entre procedências (\hat{Q}_{ST}) pode não ser um indicativo adequado para aplicação em programas de melhoramento genético por não refletirem a divergência genética em idades mais avançadas (SEBBENN et al., 2003), devendo, portanto, as avaliações terem continuidade ao menos até a idade de interesse para o programa de melhoramento em questão. Neste interim, o teste de progênie sob estudo foi implantado a campo, visando a continuidade das avaliações, bem como início do pré-melhoramento da espécie.

As correlações genéticas estimadas entre os caracteres estudados resultaram em 45,28%, 41,08% e 41,95%, aos 60, 120 e 180 dias, respectivamente. Tais valores são considerados moderados, não indicando uma associação genética entre os caracteres suficientemente forte para trabalhos de seleção indireta. Contudo, dado a tenra idade das plantas, o recomendável é estimar estas correlações em diferentes idades quando estabelecidas em campo, bem como na idade de corte.

Em relação à mortalidade observada, as taxas de mortalidade foram superiores na segunda e terceira avaliações, com 23,38 e 31,34%, respectivamente. A mortalidade inicial (3,4% aos 60 dias) foi similar ao apresentado por Paiva e Poggiani (2000), que observaram taxas de mortalidade variando de 1,25% a 5%, em diferentes espécies nativas sendo elas, Ipê-Roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb), Angico Vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*), Guatambú (*Aspidosperma parvifolium* A. DC.), Jatobá (*Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang) e Cedro (*Cedrela fissilis* Vell.), aos 12 meses de idade. A alta taxa de mortalidade observada para *R. montana* var. *brasiliensis* no viveiro pode atribuída ao efeito de depressão por endogamia, em função de que poucas árvores produziram flores induzindo uma maior taxa de autofecundação como estratégia para perpetuação da espécie, apesar de um provável mecanismo de autoincompatibilidade parcial. Outro fator que pode ter influenciado foi a ocorrência de geadas no período de crescimento das mudas, comum na Região Sul do país, podendo as plântulas jovens apresentarem menor resistência.

REFERÊNCIAS

- BATES, D.; MÄCHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**, Innsbruck, v. 67, n. 1, p. 1-48, 2015.
- BOEGER, M. R. T.; KAEHLER, M.; MELO JÚNIOR, J. C. F.; GOMES, M. Z.; CHAVES, C. R. M.; SCHOLTTZ, E.S. Estrutura foliar de seis espécies de subosque de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista. **Hoehnea**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 521-531, 2006.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p. (v. 1)
- CANUTO, D. S. O.; ZARUMA, D. U. G.; MORAES, M. A.; SILVA, A. M.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. Caracterização genética de um teste de progênies de *Dipteryx alata* Vog. proveniente de remanescente florestal da Estação Ecológica de Paulo de Faria, SP, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 641-648, 2015.
- COSTA, R.B.; ROA, R.A.R.; XAVIER, T.M.; FLORES, H.C.G. Desenvolvimento inicial de progênies de Ipê amarelo (*Tabebuia chrysostricha* (Mart. ex A. DC.) Standl.) no município de Campo Grande, MS, Brasil. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Campo Grande, v. 11, n. 2, p. 39-45, 2007.
- DUVICK, D. N. Genetic enhancement and plant breeding. *In*: JANICK, J.; SIMON, J.E. (eds.). **Advances in new crops**. Portland: Timber Press, 1990. p. 90-96.
- FUPEF. **Conservação do Bioma Floresta com Araucária: Diagnóstico dos remanescentes florestais**. Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná: Curitiba, 2001. (v. 1).
- GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Degaspari, 2000.
- HADDAD, N. M.; BRUDVIG, L. A.; CLOBERT, J.; et al. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. **Science Advances**, [s.l.], v. 1, n. 2, e1500052, mar. 2015.
- HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 618-620, 2002.
- LEDO, C. A. S.; SILVA, S. O.; CONCEIÇÃO, K. S. Avaliação do coeficiente de variação na experimentação com bananeira. *In*: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA, 5., 2003, Paracatu. **Anais [...]**. Brasília: Embrapa, p. 238-240, 2003.
- 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**, St. Louis, v. 82, n. 11, p.1420-1425, 1995.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. 2. ed. Rio de Janeiro: José Olympio, 1981.

MAINIERI, C. **Madeiras do litoral Sul: São Paulo, Paraná e Santa Catarina**. São Paulo: Instituto Florestal, 1973.

MEDEIROS, J. D.; SAVI, M.; BRITO, B. F. A. Seleção de áreas para criação de Unidades de Conservação na Floresta Ombrófila Mista. **Biotemas**, Florianópolis, v. 18, n. 2, p. 33-50, 2005.

MENEGATTI, R.D.; MANTOVANI, A.; NAVROSKI, M.C. Parâmetros genéticos para caracteres de crescimento inicial de progênies de bracatinga em Lages, SC. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [s. l.], v. 36, n. 87, p. 235-243, 2016.

MORAES, M. A.; MORAES, S. M. B.; SILVA, E. C. B.; KUBOTA, T. Y. K.; SILVA A. M.; RESENDE, M. D. V.; MORAES, M. L. T. Variação genética em progênies de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. utilizando o delineamento sistemático tipo "leque". **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 175-183, 2013.

NASS, L.L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 581-587, 2000.

OLIVEIRA, M. S. P.; MOCHIUTTI, S.; FARIAS, N. J. T. Domesticação e melhoramento do açaizeiro. *In*: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (org.). **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa: Editora UFV, 2009. p.207-236.

PAIVA, A.V.; POGGIANI, F. Seedlings growth of native tree species in plantation in the understory of a forest fragment, **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 57, p. 141-151, 2000.

PAULA, J.E.; ALVES, J.L.H. **Madeiras nativas: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso**. Brasília: Fundação Mokiti Okada – MOA, 1997.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 06 mar. 2019.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. **Araucariáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1996.

RESENDE, M. D. V. Delineamento de experimentos de seleção para maximização da acurácia seletiva e do progresso genético. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 19, n. 4, p. 479-500, 1995.

SEBBENN, A.M. Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) em mata ciliar a partir de isoenzimas. 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

SEBBENN, A.M.; SIQUEIRA, A.C.F.M.; GARRIDO, L.M.G.; ANGERAMI, E.M. Variabilidade genética e interação genótipo x locais em Jaquitibá-Rosa - *Cariniana*

legalis (Mart.) O. Ktze. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.12, n.1, p. 13-23, 2000.

SEBBENN, A. M.; PONTINHA, A. A. S.; GIANNOTTI, E.; KAGEYAMA, P. Y. Variação genética entre e dentro de procedências de *Araucaria angustifolia* no sul do Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 109-124, 2003.

SEBBENN, A. M.; PONTINHA, A. A. S.; FREITAS, S. A.; FREITAS, J. A. Variação genética em cinco procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no sul do Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 91-99, 2004.

SEBBENN, A. M. Sistemas de reprodução em espécies tropicais e suas implicações para seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. *In*: HIGA, A. R. **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. p. 93-138.

SHIMIZU, J. Y. Estratégia complementar para conservação de espécies florestais nativas: resgate e conservação de ecótipos ameaçado. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [s.l.], v. 54, p. 7-35, 2007.

SILVA, J. M.; AGUIAR, A. V.; MORI, E. S.; MORAES, M. L. T. Divergência genética entre progênies de *Pinus caribaea* var. *caribaea* com base em caracteres quantitativos. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [s.l.], v. 32, n. 69, p. 69-77, 2012.

SOUZA, V. A.; AGUIAR, A. V. **Programa de melhoramento genético de araucária da Embrapa Florestas: situação atual e perspectivas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2012.

TAMBARUSSI, E. V.; PEREIRA, F. B.; SILVA, P. H. M.; LEE, D.; BUSH, D. Are tree breeders properly predicting genetic gain? A case study involving *Corymbia* species. **Euphytica**, [s.l.], v. 214, n. 8, 150, 2018.

WADT, L. H. O.; KAINER, K. A. Domesticação e Melhoramento de Castanheira. *In*: BOREM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R.; (ed.). **Domesticação e melhoramento de espécies Amazônicas**. 1. ed. 2009. p. 297-317.

WORLD TIMBERS INC. Wood database and searchable library. **Roupala brasiliensis**. Disponível em: https://www.woodworkerssource.com/online_show_wood.php?wood=Roupala%20brasiliensis. Acesso em: 26 dez. 2019.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 11, n. 10, p. 413-418, 2001.

CAPÍTULO 2¹
ISOLATION OF 27 POLYMORPHIC NUCLEAR MICROSATELLITE MARKERS
FOR *Roupala montana* var. *brasiliensis* (PROTEACEAE)

Fernanda B. Pereira, Alexandre M. Sebbenn, Bruno C. Rossini, Guilherme F. Melchert, Celso L. Marino, Paulo E.M. Ribolla, Diego P. Alonso, Edson José Vidal Da Silva & Evandro V. Tambarussi

Abstract

Microsatellite primers pairs were developed for the Neotropical tree *Roupala montana* var. *brasiliensis* for use in studies on genetic diversity, mating system, and gene flow. Forty-two primer pairs were developed, resulting in 27 polymorphic loci, with two to 27 alleles per locus. The primer pairs were validated against 34 *R. montana* var. *brasiliensis* adult trees from four populations. The observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities ranged among loci from 0.061 to 0.930 (mean of 0.544) and from 0.116 to 0.950 (mean of 0.700), respectively. Null alleles were observed for ten loci. No genotypic linkage disequilibrium was detected in any pair of loci. This set of loci is suitable for population genetic studies of the species.

Keywords: Brazilian lacewood. Brazilian oak. High-throughput sequencing. SSR markers.

¹ Post-print do artigo aceito para publicação na revista Annals of the Brazilian Academy of Sciences na data de 24 de Agosto de 2020. Termos de licença de reprodução: Creative Commons CC-type BY (CC BY 4.0).

2.1 INTRODUCTION

Twenty-one species and variations of the *Roupala* (Proteaceae) genus have been reported in Brazil (PRANCE et al., 2007), including lacewood (*Roupala montana* var. *brasiliensis* (Klotzsch) K.S. Edwards). Although non-endemic, this species occurs from the south of Bahia State to Rio Grande do Sul State, mainly on wet slopes and in small depressions (REGO, 2009; GBIF, 2019). Classified as secondary species (SAWCZUK et al., 2012) or light-demanding climax species (SEUBERT et al., 2017), lacewood presents hermaphrodite flowers that are pollinated by small insects, and seeds are dispersed by wind (CARVALHO, 2003; BOERGER et al., 2006). The trees can reach heights of 20 to 30 m and diameters at the breast height (dbh) between 30 and 100 cm (BOERGER et al., 2006).

Used for furniture, and civil and naval construction due to its high-quality wood (CARVALHO, 2003; PRANCE et al.; 2007), lacewood replaced the wood of *Cardwellia sublimis* (Proteaceae) when it became scarce in Australia (WORLD TIMBERS INC., 2019). Despite its importance as a wood species, there is a lack of knowledge about genetic diversity, reproductive system, gene flow and conservation status in their natural populations. Previous genetic studies have been conducted using molecular markers of chloroplast and ribosomal DNA and have focused on understanding the phylogeny and phylogeography of the Proteaceae family (HOOT; DOUGLAS, 1998; HOOT et al., 1999; BARKER et al., 2007).

Microsatellite loci or Simple Sequence Repeats (SSR) are highly informative molecular markers because of the differences in the number of repeated units; they are also codominant, multiallelic, and abundant in the genome, which makes them useful for a wide range of applications such population genetic studies (GOVINDARAJ et al., 2015; VIEIRA et al., 2016). Thus, the limiting factor in the use of microsatellites is obtaining primers to amplify the SSR loci. Here, we describe the isolation of 27 nuclear microsatellite markers for *R. montana* var. *brasiliensis* that provide the foundation for further research on genetic diversity, population structure, reproductive system, conservation genetics, and possibly assist breeding programs.

2.2 MATERIAL AND METHODS

We used two methods to develop SSR markers. Total genomic DNA was extracted from leaves of a single *R. montana* var. *brasiliensis* individual (Table S1), using the protocol based on Doyle and Doyle (1990) proposed by Faleiro et al. (2003), with modifications. A microsatellite-enriched genomic library was constructed following Billotte et al. (1999). The genomic DNA was digested using the *RsaI* enzyme (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), enriched in microsatellite fragments using (CT)₈ and (GT)₈ motifs. The enriched fragments were cloned into pGEM-T Easy Vector (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA); ligation products were used to transform Epicurian Coli XL1-Blue *Escherichia coli*-competent cells (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) that were cultivated on plates with LB medium containing 100 µg/mL ampicillin, 100 µg/mL tetracycline, 2% X-galactosidase, and 20% of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Ninety-six recombinant colonies were sequenced using the adapters *Rsa21* (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3') and *Rsa25* (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3') in a 3730xl DNA Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and the BigDye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Vector segments from each sequence were removed by VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). Pairs of primers were designed using Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2012) (parameters: primer size of 18–25 bp; annealing temperature (T_a) between 52–65 °C; GC content between 40–60%; amplified fragment size of 100-300 bp). A ThermoFisher Multiple Primer Analyzer (ThermoFisher Scientific) was used to verify primer pair quality.

Table S1 – *Roupala montana* var. *brasiliensis* adult trees used to develop microsatellite loci with two detection methods, including 27 trees used for microsatellite loci validation

Population	Sample size	Laboratory code	Latitude	Longitude
Microsatellite loci development				
FLONA-Irati	1	M4	25°23'2.3" S	50°35'2.3" W
FLONA-Irati	1	M3	25°23'0.1" S	50°35'4.2" W
Imbituvão	1	JM1 AD01	25°31'1.6" S	50°32'56.7" W
Imbituvão	1	JM1 AD04	25°31'9.6" S	50°32'38.9" W
FLONA-Três Barras	1	M439	26°14'36.2" S	50°18'5.5" W
Microsatellite loci validation				
FLONA-Irati	13	-	25°23'14" S	50°34' 45" W
Imbituvão	8	-	25°31'20" S	50°33'30" W
Colégio Florestal	8	-	25°30'20" S	50°38 00" W
FLONA-Três Barras	5	-	26°12'30" S	50°17'30" W
Total	34	-	-	-

The second method used was based on High-throughput Sequencing (MiSeq Sequencing System, Illumina), with a Nextera DNA Flex Library Prep kit (Illumina, Inc). Total genome DNA extracted from five individuals (Table S1) was used in a paired-end sequencing run performed in MiSeq Reagent Nano Kit, v2 (500 cycles), with a low coverage approach. We used the SSR_pipeline software (MILLER et al., 2013) to verify sequence quality and contigs and identify the SSR loci (parameters: motifs of two to six nucleotides and 40 bp flanking regions). The primer pairs were designed using the BatchPrimer3 v1.0 software (YOU et al., 2008).

All primer pairs were synthesized with the M13 tail (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') (SHUELKE, 2000). The temperature gradient test (52.0, 53.7, 56.1, 57.3, 59.9, 61.9 °C) was applied to choose the best T_a for each primer pair and those that did not work were discarded. The microsatellite loci were amplified by PCR in a final volume of 10 μ L (5 μ L GoTaq Colorless Master Mix (2 \times) (Promega Corporation), 0.6 μ L of primer mix (F+R), 0.5 μ L bovine serum albumin (Thermo Fisher Scientific), 0.3 μ L fluorescent dyes (6-FAM, NED, VIC, PET), 2.6 μ L Nuclease-Free Water, and 1.0 ng template DNA). The amplification program for all primers was: i) initial denaturing step at 94 °C for 5 min; ii) 35 amplification cycles (94 °C for 30 s, 1 min at the specific T_a , 72 °C for 1 min); iii) 12 cycles of M13 tail incorporation (94 °C for 30 s, 53 °C for 1 min 30 s, 72 °C for 1 min 30 s); iv) a final elongation step at 72 °C for 20 min. Amplifications were performed with a Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The amplification product (1 μ L) of each reaction was separated on an ABI

3500 DNA analyzer (Applied Biosystems) and the GeneMapper v5 software (Applied Biosystems) was used to analyze the genotypic data.

For primer validation, we sampled a total of 34 *R. montana* var. *brasiliensis* adult trees from four South Brazilian populations (Table S1). The number of alleles per locus (k), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities, and the genotypic linkage disequilibrium (LD) were estimated using the FSTAT software (GOUDET, 2002). The statistical significance of LD was tested using 1000 Monte Carlo permutations (alleles among individuals) and a Bonferroni correction (95%, $\alpha = 0.05$). We tested deviation from expected heterozygosity ($\alpha = 5\%$) based on the fixation index (F) for each locus for the largest population (FLONA-Irati, $N=13$), using the functions *basicStats* and *divBasic* in the *diveRsity* package (KEENAN et al., 2013) implemented in the R software environment (R CORE TEAM, 2018). We also estimated null allele frequencies for each locus using a Maximum Likelihood approach (PIM) implemented in INEST 2.1 program (CHYBICKI; BURCZYK, 2009).

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

After the initial test of primer pair amplification, we discarded those that did not successfully yield amplified fragments. From the first method to detect SSR, a total of 22 simple sequence repeat (SSR) markers were selected for primer synthesis, but only 16 markers (Rmb4 to Rmb20) were useful (Table 1). Based on the second method, of the 20 initially synthesized markers, only 11 were useful (Rmb23 to Rmb44). The number of alleles per locus (k) ranged among loci from 2 to 27 (total = 338; mean = 12.5). Observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.062 to 0.930 (mean = 0.544) and expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.116 to 0.965 (mean = 0.700). No genotypic linkage disequilibrium was detected in any pair of loci (data not shown). The presence of null alleles was observed at ten of the 27 loci. Loci Rmb6 and Rmb19 showed the lowest polymorphism ($k = 2$).

Table 1 – Microsatellite primers developed for *Roupala montana* var. *brasiliensis*

Locus	Primer sequences (5'-3')		Repeat motif	Size range (bp)	T_a (°C)	n	k	H_o	H_e	Accession no.
	Forward	Reverse								
Rmb4	GACAGCTAAATGTAGGTCTCTTTG	GCCTGCAATACTACAAGCAG	(AG) ₁₆	144 - 202	59.9	33	27	0.752	0.965*	MN961599
Rmb5	CATGTCAGTTGCCAAACAAC	CAGCACAGGATACCAGTGTTTA	(AG) ₁₂	143 - 197	57.4	34	21	0.737	0.930*	MN961600
Rmb6	GTTTGAGCATTTCCTTCACC	CTACAAAAACGAACCACCAT	(GT) ₆	139 - 141	57.4	34	2	0.170	0.163	MN961601
Rmb7	GTCACGGAAAGAAGGAAAAG	AGGGATAGGTGGGGATAGAG	(CT) ₈ (CT) ₁₂	193 - 247	53.7	34	26	0.899	0.962	MN961602
Rmb8	GAACAGCTCAAAGGAAAAGG	CTCCTGTGTCCTGTGAGAGA	(GA) ₁₇	228 - 266	53.7	31	13	0.347	0.883*	MN961603
Rmb9	CGTCCTTAAGTTGGTCAAGC	GGAACAAAGGAGAAAAATGG	(GA) ₉	149 - 165	59.9	33	5	0.334	0.618*	MN961604
Rmb10	TAAAGGGGACAAGCTACCAG	ATGACACGAAGAATGCCATA	(GA) ₁₀ (AG) ₁₃	302 - 358	53.7	33	21	0.818	0.950	MN961605
Rmb11	GTCAGGGAGAGAGAACAGGA	CTCCAGTTTGTGAAAAGAC	(CT) ₂₁	166 - 204	57.4	34	14	0.906	0.887	MN961606
Rmb13	CCACCTCTTCCACTACCACT	GAAGAGGAGTGGATCTTAAATAGC	(AG) ₁₀	143 - 195	53.7	34	14	0.856	0.794	MN961607
Rmb14	GGTGAGACCTCAATTCCATC	CTGCGTCAATACCATCTGAG	(TG) ₆ (TC) ₈	182 - 218	57.4	34	16	0.693	0.876	MN961608
Rmb15	GGCTCATGCGTAATGAAATAG	ATGACACTTGCTCAGGGAAC	(CT) ₉ (CT) ₂₂	219 - 315	59.9	30	19	0.334	0.951*	MN961609
Rmb16	AATATTGAGGCATGGTTGCT	GGTATGTTTCAGGGCAAAAAG	(GT) ₇	300 - 316	53.7	34	6	0.552	0.471	MN961610
Rmb17	ATCAAATCCCAACTCTCAAG	GGCCACCTACATAGTGATCC	(CT) ₁₀	123 - 227	57.4	34	17	0.378	0.925*	MN961611
Rmb18	GTTGTTGCCTGTACAGATG	GGGGATTTCATTCTAAGGT	(CT) ₈	247 - 253	53.7	34	5	0.372	0.431	MN961612
Rmb19	CAGACAATGCCTTCAAGCTA	GATTGATCCGTGGAATATGAG	(TC) ₈	256 - 258	53.7	33	2	0.077	0.116	MN961613
Rmb20	CCTTGCAAAGATGAAGCAAT	GGAATCGAAATCGAAACTACC	(CT) ₈	119 - 179	56.1	34	22	0.930	0.949	MN961614
Rmb23	TCCACAGCAATATCAAATGT	TTTGAAAGATTTGTAACGTGTC	(GT) ₈	133 - 175	59.9	34	14	0.849	0.896	MT001925
Rmb24	GTAACCTCAAACAATGCAGAA	CCAACGCAACATATATTGTAA	(AT) ₈	098 - 158	59.9	33	11	0.642	0.787	MT001926
Rmb28	ACTCAACTTCAAGAACCATT	AGGTCTGAATTTTCAGGAGAC	(ATC) ₆	106 - 124	53.7	34	5	0.271	0.340	MT001927
Rmb29	AAGATGGCCAAGATTAATGA	CCCATTAAGTATAATTGAGTC	(ATT) ₇	123 - 155	57.4	32	13	0.609	0.843*	MT001928
Rmb33	TGTAAATAAAGTTGGGTTGGT	AAAGACAGCTCCTACCCATAA	(TTG) ₆	116 - 130	56.1	33	5	0.577	0.510	MT001929
Rmb34	ACAAAACTACCGAGGCTAGA	AAAGCTCATAAACTGCTGAAA	(TA) ₇	100 - 174	52.0	28	4	0.256	0.257	MT001930
Rmb35	CACTGCCAAATCAAACCTTAG	GAATTGTTGATGGCTTCTTTT	(CT) ₈	116 - 120	59.9	32	3	0.519	0.556	MT001931
Rmb36	CAAGACTTCTTTGAGCTTTGT	TTGTTTTGGCTAGTGAAATTG	(TC) ₉	115 - 167	59.9	27	4	0.061	0.212	MT001932
Rmb40	CTTCACTGATATCGTCTCTGG	TTCTTTGATCTGAAATCTGGA	(TC) ₂₁	101 - 155	53.7	32	19	0.628	0.940*	MT001933
Rmb43	ACATACAACACACCACATGC	CAGAAGGAATGAAAATGAAGA	(TC) ₈	099 - 195	53.7	34	13	0.515	0.753*	MT001934
Rmb44	CAGCAAGAATAACAAAGGATG	TAGCTTAGCTTGTTCATGGT	(AG) ₁₆	082 - 114	53.7	33	17	0.603	0.929*	MT001935
Overall							12.5	0.544	0.700	

Note: T_a is the annealing temperature when run individually; n is the sample size; k is the number of alleles per locus; H_o is the observed heterozygosity; H_e is the expected heterozygosity. Bold H_e values indicate significant departure from Hardy-Weinberg Equilibrium ($\alpha = 95\%$) based on the “FLONA-Irati” population. * indicates loci with significant frequency of null alleles.

Polymorphic markers are fundamental tools to obtain accurate estimates of genetic diversity parameters and the structure of populations (ROSSINI et al., 2018). The 27 loci are suitable for use in further studies of *R. montana* var. *brasiliensis*, including genetic diversity, genetic structure, mating system, gene flow, and parentage analysis. Furthermore, considering that many species are located in fragmented ecosystems that are rapidly and constantly being diminished due to human activities, including logging or urban and agricultural expansion, and that these species can be studied in a comparative way (BARBARÁ et al., 2007), the potential for cross-species microsatellite transferability is key to facilitating studies and reducing costs (HOEBEE, 2011; FORTI et al., 2014). A large number of suitable loci increases the probability of success of cross-species transferability. Thus, the SSR primer pairs developed herein may be useful in determining the conservation status of the studied species and inform research about other *Roupala* species, particularly those that are endangered, which in turn contributes to a greater understanding of the Proteaceae family and forest conservation genetics.

REFERENCES

- BARBARÁ T, PALMA-SILVA C, PAGGI GM, BERED F, FAY MF & LEXER C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol Ecol* 16: 3759–3767.
- BARKER NP, WESTON PH, RUTSCHMANN F & SAUQUET H. 2007. Molecular dating of the ‘Gondwanan’ plant family Proteaceae is only partially congruent with the timing of the break-up of Gondwana. *J Biogeogr* 34(12): 2012–2027.
- BILLOTTE N, LAGODA PJL, RISTERUCCI AM & BAURENS FC. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277–288.
- BOEGER MRT, KAEHLER M, MELO JÚNIOR JCF, GOMES MZ, CHAVES CRM, SCHOLTTZ ES. 2006. Estrutura foliar de seis espécies de sub-bosque de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista. *Hoehnea* 33: 521-531,
- CARVALHO PER. 2003. Espécies Arbóreas Brasileiras. Coleção Espécies Arbóreas Brasileira. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, v. 1, p. 1039.
- CHYBICKI IJ, BURCZYK J. 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *J. Hered* 100(1): 106–113.
- DOYLE JJ & DOYLE JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- FALEIRO FG, FALEIRO ASG, CORDEIRO MCR & KARIA CT. 2003. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 5 p.
- FORTI G, TAMBARUSSI EV, KAGEYAMA PY, MORENO MA, FERRAZ EM, IBAÑES B, MORI GM, VENCOVSKY R & SEBBENN AM. 2014. Low genetic diversity and intrapopulation spatial genetic structure of the Atlantic Forest tree, *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). *Ann For Res* 57(2): 165–174.
- GBIF SECRETARIAT: GBIF Backbone Taxonomy. *Roupala brasiliensis* Klotzsch. Available in <<https://www.gbif.org/species/7286963>> Accessed on 20 December 2019.
- GOUDET J. 2002. FSTAT version 2.9.3.2, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Available in <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>> Accessed on 20 August 2017.
- GOVINDARAJ M, VETRIVENTHAN M & SRINIVASAN M. 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genet Res Int*: Article ID 431487.
- HOEBEE SE. 2011. Development and cross-species amplification of microsatellite markers from the endangered Wee Jasper *Grevillea* (*Grevillea iaspicula*, Proteaceae). *Muelleria* 29(1): 93–96.

- HOOT SB & DOUGLAS AW. 1998. Phylogeny of the Proteaceae based on *atpB* and *atpB-rbcL* intergenic spacer region sequences. *Aust Syst Bot* 11:301–320.
- HOOT S, MAGALLON S & CRANE P. 1999. Phylogeny of basal Eudicots based on three molecular data sets: *AtpB*, *rbcL*, and 18s nuclear ribosomal DNA sequences. *Ann Missouri Bot Gard* 86(1):1–32.
- KEENAN K, MCGINNITY P, CROSS TF, CROZIER WW, PRODÖHL PA. 2013. *diveRsity*: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods Ecol Evol* 4: 782–788.
- MILLER MP, KNAUS BJ, MULLINS TD & HAIG SM. 2013. *SSR_pipeline*: A bioinformatic infrastructure for identifying microsatellites from paired-end Illumina high-throughput DNA sequencing data. *J Hered* 104(6): 881–885.
- PRANCE G, PLANA V, EDWARDS KS & PENNINGTON R. 2007. Proteaceae. *Flora Neotrop* 100: 211–218.
- R CORE TEAM. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available in <<https://www.R-project.org/>> Accessed on 06 March 2019.
- REGO GM. 2009. Monitoramento da fenologia de espécies arbóreas das florestas brasileiras. Colombo: Embrapa Florestas.
- ROSSINI BC, KAMPA MB, MARINO CL, PEREIRA FB, ALVES FM, PEREIRA DE SOUZA A, IBANES B, SCHWARCZ KD, ZUCCHI MI, BOBROWSKI R, PERES FSB & TAMBARUSSI EV. 2018. A new set of microsatellite loci for *Cattleya walkeriana* Gardner, an endangered tropical orchid species and its transferability to *Cattleya loddigesii* Lindl. and *Cattleya nobilior* Reichenbach. *Plant Genet Resour-C* 16(3): 284–287.
- SAWCZUK AR, FIGUEIREDO-FILHO A, DIAS NA, WATZLAWICK LF, STEPKA TF. 2012. Alterações na estrutura e na diversidade florística no período 2002-2008 de uma Floresta Ombrófila Mista Montana do Centro-sul do Paraná, Brasil. *Floresta* 42(1): 1-10.
- SCHUELKE M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18: 233–234.
- SEUBERT RC, MAÇANEIRO JP, SCHORN LA, SEBOLD DC. 2017. Regeneração natural em diferentes períodos de abandono de áreas Após extração de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, em Argissolo Vermelho-amarelo álico, em Brusque, Santa Catarina. *Cienc Florest* 27(1): 1-19.
- UNTERGASSER A, CUTCUTACHE I, KORESSAAR T, YE J, FAIRCLOTH BC, REMM M & ROZEN SG. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40: e115.
- VIEIRA MLC, SANTINI L, DINIZ AL & MUNHOZ CF. 2016. Microsatellite markers: what mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol* 39: 312–328.
- WORLD TIMBERS INC. 2019. Wood database and searchable library: *Roupala brasiliensis*. Available in <

https://www.woodworkerssource.com/online_show_wood.php?wood=Roupala%20brasiliensis>

YOU FM, HUO NX, GU YQ, LUO MC, MA YQ, HANE D, LAZO GR, DVORAK J & ANDERSON OD. 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. BMC Bioinform 9: 253.

CAPÍTULO 3²

FIRST VALIDATED SET OF MICROSATELLITE LOCI FOR *Roupala montana* var. *brasiliensis* (KLOTZSCH) K. S. EDWARDS (PROTEACEAE)

Fernanda B. Pereira, Alexandre M. Sebbenn, David Boshier, Bruno C. Rossini, Celso L. Marino, Edson José Vidal Da Silva & Evandro V. Tambarussi

Abstract

Roupala montana var. *brasiliensis* is a Neotropical tree species, occurring in Brazil on intensive anthropized Biomes of Cerrado and Atlantic Forest. Commercially exploited to replace *Cardwellia sublimis* wood in the international market until become scarce too, there is no knowledge on the conservation status of its natural populations, nor elementary aspects such as mating system and gene flow, which are essential for sustainable management and determination of strategies for species conservation. We analyzed the Mendelian inheritance, genetic linkage, and linkage genotypic disequilibrium (LD) for nine species-specific microsatellite loci, to verify whether its are suitable genetic markers for population genetic studies of *R. montana* var. *brasiliensis*. Mendelian inheritance and genetic linkage were determined on based of allele segregation of heterozygous loci of seven maternal trees on its open-pollinated progenies (21–52 seedlings/progeny) and the LD, using adults (5-14 adult trees) and regenerant individuals (12–185/population) of four populations of Mixed Ombrophilous Forest. After Bonferroni's corrections, there were no significant deviations from the expected Mendelian inheritance segregation, linkage, or LD for the nine evaluated loci. The results show that the set of microsatellite loci can be used to conduct studies of genetic diversity, genetic structure, mating system, inbreeding, kinship, and gene flow for *R. montana* var. *brasiliensis*.

Key-words: Brazilian lacewood. Brazilian oak. Conservation genetics. SSR markers.

² Pre-print do artigo submetido para avaliação para publicação na revista Annals of the Brazilian Academy of Sciences na data de 07 de janeiro de 2021.

3.1 INTRODUCTION

Roupala montana var. *brasiliensis* (Klotzsch) K.S. Edwards, known in the international wood market as Brazilian lacewood is a Neotropical tree species which occurs naturally in Brazilian areas of Cerrado and Atlantic Forest, in formations such as gallery, riparian and rain forests, from southern Bahia to Rio Grande do Sul state (LORENZI, 2008). However, despite a wide distribution in Brazil, the species occurs at low population densities (<1 tree ha^{-1}). Brazilian lacewood was exploited as a substitute for *Cardwellia sublimis*, the Australian lacewood, when it became scarce in Australia (WORLD TIMBERS INC., 2019). Its high-quality wood is compared to European oak, from which one of its popular names derives - Brazilian oak, and is used in furniture, naval, and civil construction (PRANCE et al., 2007), which makes it an economically important species. However, despite the importance and potential of the species, its exploitation and occurrence in heavily anthropized biomes, there is no information regarding the genetic conservation status of its natural populations, nor basic genetic aspects, such as genetic diversity, mating system, and gene flow, for devising sustainable management and conservation strategies for the species. Previous studies have focused on understanding the phylogeny and phylogeography of the Proteaceae family, using DNA chloroplast and ribosomal molecular markers (HOOT; DOUGLAS, 1998; HOOT et al., 1999; BARKER et al., 2007). To generate such needed information, we can use genomic microsatellite markers (Simple Sequences Repeats - SSR) due to their high information content and discriminatory power, codominance and multiallelism (LI et al., 2018). However, for population genetics studies the developed SSR markers must also fit assumptions of Mendelian inheritance, and show an absence of genetic linkage, and linkage genotypic disequilibrium (LD) between loci (TAMBARUSSI et al., 2013). Thus, we investigated the Mendelian inheritance, genetic linkage, and LD to validate nine newly developed microsatellite loci for *R. montana* var. *brasiliensis* (PEREIRA et al., 2020, in press).

3.2 MATERIAL E METHODS

3.2.1 Experimental areas and sampling

The study was conducted on four populations of *R. montana* var. *brasiliensis*, located in state of Paraná in the south of Brazil, (Table 1). All four populations occur in Mixed Ombrophilous Forest, under the Cfb climatic class of Koppen (mesothermal, humid subtropical, no dry season) (APARECIDO et al., 2016). Over two years of monitoring reproductive phenology (2017, 2018), only a single reproductive event was observed in the FI and IB populations, located in the Fernandes Pinheiro municipality. Fruits were collected directly from the canopy of three trees in FI and four trees in the IB population. The number of germinated seeds ranged from 6 to 52 per seed-tree. To investigate Mendelian inheritance and genetic linkage between pairwise loci, and to avoid false positives due to low sample size, only four families, with 21 to 52 seedlings (total of 161 seedlings) were used when leaf material was collected for genotyping. To investigate linkage genotypic disequilibrium, we collected leaves from all adult (35) and juvenile (305) individuals found in the four populations.

Table 1 – Characteristics of *Roupala montana* var. *brasiliensis* populations located in Mixed Ombrophilous Forest areas, in southern Brazil

Population	N	n_r	n_{st}	n_s	Area (ha)	HD	Latitude	Longitude	Location
FI	14	12	3	35	25	Undisturbed	25°23'14" S	50°34'45" W	Fernandes Pinheiro, PR
IB	8	185	4	126	400	Disturbed	25°31'20" S	50°33'30" W	Fernandes Pinheiro, PR
CF	8	93	0	0	32	Undisturbed	25°30'20" S	50°38'00" W	Irati, PR
TB	5	15	0	0	26	Undisturbed	26°12'30" S	50°17'30" W	Três Barras, SC
Total	35	305	7	161	-	-	-	-	-

N : adult sample size; n_r : total number of regenerants (juveniles) sampled; n_{st} : seed-trees sampled in 2018; n_s : total number of seedlings; FI: National Forest of Irati; IB: Imbituvão; CF: Centro Estadual Florestal; TB: National Forest of Três Barras; HD: history of disturbance; ⁵Seed-trees code from FI: M2, M4, and M8; Seed-trees code from IB: M1, M25, M68, and M69.

3.2.2 DNA extraction and microsatellite analysis

Total genomic DNA was extracted from leaves of adult trees, regenerants and seedlings, using the protocol based on Doyle and Doyle (1990), with modifications

proposed by Faleiro et al. (2003). Twelve primer pairs developed by Pereira et al. (2020, in press) were used (Rmb4, Rmb5, Rmb7, Rmb10, Rmb11, Rmb13, Rmb14, Rmb20, Rmb23, Rmb29, Rmb40, and Rmb44). The microsatellite loci were amplified by PCR following the reaction and amplification program described by Pereira et al. (2020, in press). Amplifications were performed with a Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) with the amplification product (1 μ L) of each reaction separated on an ABI 3500 DNA analyzer (Applied Biosystems) and the GeneMapper v5 software (Applied Biosystems) used to analyze the genotypic data.

3.2.3 Analysis of Mendelian inheritance, genetic and linkage disequilibrium

To investigate if the nine loci fit the classic model of Mendelian inheritance, we used the Gillet and Hattemer (1989) method, which compares the heterozygous genotype of seed-trees with segregation patterns in their open-pollinated progeny. This method assumes that all the loci have a regular segregation, following a Mendelian pattern, and there is: i) regular meiotic segregation during ovule production; ii) random fertilization of ovules; and iii) no selection between the moment of fertilization and the genotyping of seedlings. Other basic assumptions for this method are the codominant relationship among all alleles and the presence of at least one maternal allele in each seedling. For heterozygous seed-trees ($A_iA_j, i \neq j$): i) each individual within the progeny has at least one maternal allele (A_i or A_j); ii) the number of heterozygous individuals A_{ij} (n_{ij}) should be equal to the sum of the homozygous individuals A_iA_i (n_{ii}) and A_jA_j (n_{jj}): $n_{ij} = n_{ii} + n_{jj}$; iii) the number of heterozygous individuals with an allele i (A_iA_k (n_{ik})) must equal the number of heterozygous individuals with allele j (A_jA_k (n_{jk})), that is, $n_{ik} = n_{jk}$, where $k \neq i, j$. The observed segregation for each heterozygous mother was compared to the expected pattern of 1:1 segregation using the maximum likelihood G-test (SOKAL; ROHLF, 1981):

$$G1 = 2 \left[n_{ij} \ln \left(\frac{n_{ij}}{E(n1)} \right) + (n_{ii} + n_{jj}) \ln \left(\frac{(n_{ii} + n_{jj})}{E(n1)} \right) \right], \text{ where } n_i \text{ and } n_j \text{ are the number of observed}$$

genotypes that contains the maternal alleles A_i and A_j , and $E(n1)$ is the expected number of progeny with the genotype A_jA_j (n_{jj}), and

$$A_iA_i + A_jA_j (n_{ii} + n_{jj}) : E(n1) = 0.5(n_{ij} + n_{ii} + n_{jj}); \text{ OR}$$

$G2 = 2 \left[n_{ik} \ln \left(\frac{n_{ik}}{E(n2)} \right) + n_{jk} \ln \left(\frac{n_{jk}}{E(n2)} \right) \right]$, where $E(n2)$ is the expected number for the progeny genotype $A_i A_k$ (n_{ik}) and $A_j A_k$ (n_{jk}), and $A_i A_k + A_j A_k (n_{ik} + n_{jk}) : E(n2) = 0.5(n_{ik} + n_{jk})$. The Bonferroni correction for multiple comparisons (95%, $\alpha = 0.05$) was used to avoid false positives.

We tested genotypic linkage between pairs of loci based on the genetic information from heterozygous seed-trees for both loci ($A_i A_j$, $B_l B_m$), observing segregation among the progeny. The expected pattern of Mendelian segregation among progeny is 1:1:1:1, which was tested for based on the maximum likelihood G-test (SOKAL; ROHLF, 1981),

$$G = 2 \left[n_{il} \ln \left(\frac{n_{il}}{E(n)} \right) + n_{im} \ln \left(\frac{n_{im}}{E(n)} \right) + n_{jl} \ln \left(\frac{n_{jl}}{E(n)} \right) + n_{jm} \ln \left(\frac{n_{jm}}{E(n)} \right) \right]$$

, where n_{il} , n_{im} , n_{jl} , and n_{jm} are the observed numbers and $E(n)$ is the expected number for the genotypes $A_i B_l$, $A_i B_m$, $A_j B_l$, and $A_j B_m$, respectively, estimated by, $E(n) = 0.25(n_{il} + n_{im} + n_{jl} + n_{jm})$. The Bonferroni correction for multiple comparisons (95%, $\alpha = 0.05$) was used to avoid false positives.

We tested genotypic linkage disequilibrium between pairwise loci using FSTAT (GOUDET, 1995) only for adults and regenerants, since the seed offspring always present at least one maternal allele, which may result in a gene frequency bias that leads to linkage genotypic disequilibrium. The estimates of significance were obtained by allele permutations between individuals and Bonferroni's correction for multiple comparisons (95%, $\alpha = 0.05$).

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

Rmb4, Rmb5, and Rmb44 loci did not result in consistent genotyping data, so they were discarded. Deviations from the expected 1:1 Mendelian segregation pattern after Bonferroni's correction were detected in family (M69) for Rbm20 ($G = 11.56$) and Rbm40 ($G = 16.37$) loci (Table 2).

Table 2 – Mendelian inheritance (1:1) for nine microsatellite loci of *Roupala montana* var. *brasiliensis*

Locus/seed-tree	Maternal genotype	<i>n</i>	<i>n1</i>	$n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$	<i>G1</i>	<i>n2</i>	$n_{ik} : n_{jk}$	<i>G2</i>
Rmb10								
M1	302/322	22	2	0:2	NE	20	10:10	0
M8	316/340	21	10	3:7	1.65	11	8:3	2.36
M68	316/358	46	14	4:10	2.66	32	16:16	0
M69	316/346	52	24	13:11	0.17	28	15:13	0.14
Rmb11								
M1	190/192	22	11	9:2	4.82	11	6:5	0.09
M8	180/184	21	9	5:4	0.11	12	6:6	0
M68	172/194	46	12	8:4	1.36	34	19:15	0.47
M69	166/178	52	15	8:7	0.07	37	13:24	3.32
Rmb13								
M1	161/163	22	12	5:7	0.33	10	5:5	0
M8	159/161	21	11	5:6	0.09	10	7:3	1.65
M68	155/169	46	15	8:7	0.07	31	16:15	0.03
Rmb14								
M1	192/198	22	17	7:10	0.53	5	2:3	NE
M69	194/204	52	29	10:19	2.84	23	5:18	7.80
Rmb20								
M1	153/177	22	11	3:8	2.36	11	4:7	0.83
M8	149/171	21	5	3:2	NE	16	7:9	0.25
M68	153/167	46	19	8:11	0.48	27	15:12	0.33
M69	139/143	52	30	6:24	11.56*	22	16:6	4.72
Rmb23								
M1	143/145	21	9	6:3	1.02	12	8:4	1.36
M8	133/151	21	7	4:3	NE	14	8:6	0.29
M69	143/153	52	18	9:9	0	34	14:20	1.06
Rmb7								
M8	207/225	21	5	3:2	NE	16	8:8	0
M68	217/221	46	12	6:6	0	34	18:16	0.12
M69	225/229	47	24	8:16	2.72	23	13:10	0.39
Rmb29								
M1	135/143	21	15	4:11	3.39	6	5:1	NE
M8	127/145	21	6	2:4	NE	15	9:6	0.60
M68	123/135	33	27	7:20	6.53	6	6:0	NE
Rmb40								
M1	103/113	19	16	7:9	0.25	3	2:1	NE
M8	123/139	16	4	0:4	NE	12	3:9	3.14
M68	103/113	43	32	9:23	6.34	11	2:9	4.82
M69	103/113	50	38	7:31	16.37*	12	7:5	0.33

n, *n1*, and *n2* are the sample size, respectively; NE is not estimated; *G1* and *G2* are the G-test (degrees of freedom= 1); *G1* or *G2* values > 10.83 after Bonferroni's correction for 50 tests were accepted as statically significant different from zero; **P* < 0.05.

For the 141 G-tests performed for pairs of heterozygous loci in seed-trees, only one pair, Rmb10 x Rmb13 (*G* = 22.07), in the family M68 differed significantly from the expected under the hypothesis of an independent Mendelian segregation ratio of 1:1:1:1 (Table 3), after Bonferroni's correction. The fruits of *R. montana* var. *brasiliensis* have up to only two seeds each, and during the processing to obtain the seeds, we discarded those which showed damage by insects, the presence of fungi, or were immature (reduced size, no embryo formation, no dehiscence). Furthermore, not all viable seeds resulted in seedlings, which indicates the possible action of post-zygotic selection mechanisms, such as inbreeding depression due to natural selection (HUFFORD; HAMRICK, 2003; TARAZI et al., 2010).

Table 3 – G-test for the null hypothesis of independent segregation (1:1:1:1) between pairs of loci (genetic linkage) in seven seed-trees

Pairs of loci	Seed-tree			
	M1	M8	M68	M69
Rmb10 x Rmb11	0.34	2.56	1.40	4.85
Rmb10 x Rmb13	7.22	7.32	22.07*	NE
Rmb10 x Rmb14	3.89	NE	NE	5.23
Rmb10 x Rmb20	6.25	5.50	7.49	2.51
Rmb10 x Rmb23	4.00	5.19	NE	2.45
Rmb10 x Rmb07	NE	4.39	10.15	3.62
Rmb10 x Rmb29	7.95	5.15	3.76	NE
Rmb10 x Rmb40	0.78	2.90	4.93	1.93
Rmb11 x Rmb13	0.75	0.65	1.10	NE
Rmb11 x Rmb14	4.37	NE	NE	9.04
Rmb11 x Rmb20	3.28	0.09	3.26	8.41
Rmb11 x Rmb23	1.97	1.93	NE	6.43
Rmb11 x Rmb07	NE	3.15	0.69	3.61
Rmb11 x Rmb29	12.74	0.56	4.77	NE
Rmb11 x Rmb40	1.13	1.65	2.09	5.75
Rmb13 x Rmb14	6.64	NE	NE	NE
Rmb13 x Rmb20	2.54	2.26	1.90	NE
Rmb13 x Rmb23	1.23	1.58	NE	NE
Rmb13 x Rmb07	NE	0.13	0.78	NE
Rmb13 x Rmb29	11.33	4.82	2.41	NE
Rmb13 x Rmb40	0.22	1.47	2.11	NE
Rmb14 x Rmb20	2.36	NE	NE	2.16
Rmb14 x Rmb23	1.93	NE	NE	0.46
Rmb14 x Rmb07	NE	NE	NE	3.18
Rmb14 x Rmb29	8.88	NE	NE	NE
Rmb14 x Rmb40	3.99	NE	NE	9.93
Rmb20 x Rmb23	3.32	1.77	NE	2.31
Rmb20 x Rmb07	NE	0.98	1.52	9.87
Rmb20 x Rmb29	10.06	0.64	3.04	NE
Rmb20 x Rmb40	3.70	1.13	6.40	5.28
Rmb23 x Rmb07	NE	7.61	NE	3.34
Rmb23 x Rmb29	7.75	0.30	NE	NE
Rmb23 x Rmb40	1.94	0.57	NE	7.05
Rmb07 x Rmb29	NE	3.66	3.70	NE
Rmb07 x Rmb40	NE	1.87	2.41	1.38
Rmb29 x Rmb40	8.61	5.65	4.28	NE

NE is not estimated; To be considered statistically significant, the values of the G-test after Bonferroni correction (95%, $\alpha = 0.05$) for the 98 tests performed should be greater than 16.27. * $P < 0.05$.

The observed deviation from the hypothesis of pairwise independent loci segregation (1:1:1:1) between Rmb10 x Rmb13 in family M69 can be attributed to deviation from the expected 1:1 Mendelian segregation at the Rmb40 locus in the same family. Significant LD was observed between and in 22 (61.1%) of the 36 pairs of loci

in juveniles of IB population (Table 4). The LD in neutral genetic markers can result from deviation from random mating (self-fertilization, biparental inbreeding, and correlated mating), genetic bottleneck and founding effects (FLINT-GARCIA et al., 2003; MANOEL et al., 2015; KUBOTA et al., 2017).

Table 4 – Probability of genotypic linkage disequilibrium between pairs of loci sampled for adult trees and regenerants from each of the four populations of *Roupala montana* var. *brasiliensis*

Pairs of loci	FI		TB		CF		IB	
	Adults	Juveniles	Adults	Juveniles	Adults	Juveniles	Adults	Juveniles
Rmb10xRmb11	1.00000	1.00000	1.00000	0.69253	1.00000	0.08542	1.00000	0.00017
Rmb10xRmb13	1.00000	1.00000	1.00000	0.00260	1.00000	0.01910	1.00000	0.00017
Rmb10xRmb14	1.00000	1.00000	1.00000	0.16979	1.00000	0.02153	1.00000	0.00278
Rmb10xRmb20	1.00000	1.00000	1.00000	0.04323	1.00000	0.02934	1.00000	0.00017
Rmb10xRmb23	1.00000	1.00000	1.00000	0.37031	1.00000	0.02066	1.00000	0.00017
Rmb10xRmb07	1.00000	1.00000	1.00000	0.01736	1.00000	0.00104	1.00000	0.00017
Rmb10xRmb29	1.00000	1.00000	1.00000	0.03247	1.00000	0.00208	1.00000	0.00017
Rmb10xRmb40	1.00000	1.00000	1.00000	0.24896	1.00000	0.00278	1.00000	0.00122
Rmb11xRmb13	0.48212	1.00000	1.00000	0.52378	0.27917	0.18160	1.00000	0.00017
Rmb11xRmb14	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.51563	1.00000	0.00642
Rmb11xRmb20	0.07014	1.00000	1.00000	0.04184	1.00000	0.11510	1.00000	0.00017
Rmb11xRmb23	1.00000	1.00000	1.00000	0.39740	1.00000	0.27257	1.00000	0.00017
Rmb11xRmb07	0.06354	1.00000	1.00000	0.38993	1.00000	0.26302	1.00000	0.00017
Rmb11xRmb29	1.00000	1.00000	1.00000	0.85608	1.00000	0.38455	1.00000	0.00017
Rmb11xRmb40	0.12500	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.39028	1.00000	0.00625
Rmb13xRmb14	0.28194	1.00000	1.00000	0.06667	1.00000	0.23455	1.00000	0.00625
Rmb13xRmb20	0.10017	1.00000	1.00000	0.01424	1.00000	0.00851	1.00000	0.00017
Rmb13xRmb23	1.00000	1.00000	1.00000	0.24722	1.00000	0.39931	1.00000	0.00139
Rmb13xRmb07	0.09635	1.00000	1.00000	0.00903	1.00000	0.03177	1.00000	0.00017
Rmb13xRmb29	0.46076	1.00000	1.00000	0.00799	1.00000	0.21545	0.28733	0.00017
Rmb13xRmb40	0.19566	1.00000	1.00000	0.17413	1.00000	0.11736	1.00000	0.00556
Rmb14xRmb20	1.00000	1.00000	1.00000	0.34757	1.00000	0.40069	1.00000	0.00017
Rmb14xRmb23	1.00000	1.00000	1.00000	0.38993	1.00000	0.00017	1.00000	0.00017
Rmb14xRmb07	1.00000	1.00000	1.00000	0.37847	1.00000	0.03524	1.00000	0.00017
Rmb14xRmb29	1.00000	1.00000	1.00000	0.02153	1.00000	0.24028	0.20781	0.03351
Rmb14xRmb40	1.00000	1.00000	1.00000	0.01962	1.00000	0.16684	1.00000	0.00833
Rmb20xRmb23	1.00000	1.00000	1.00000	0.21128	1.00000	0.23455	1.00000	0.00017
Rmb20xRmb07	0.01146	1.00000	1.00000	0.20469	1.00000	0.09618	1.00000	0.00017
Rmb20xRmb29	1.00000	1.00000	1.00000	0.09253	1.00000	0.00660	1.00000	0.00017
Rmb20xRmb40	0.02309	1.00000	1.00000	0.12552	1.00000	0.33837	1.00000	0.00017
Rmb23xRmb07	1.00000	1.00000	1.00000	0.17170	1.00000	0.01146	1.00000	0.00017
Rmb23xRmb29	1.00000	1.00000	1.00000	0.04167	1.00000	0.00069	1.00000	0.00017
Rmb23xRmb40	1.00000	1.00000	1.00000	0.13576	1.00000	0.13316	1.00000	0.00035
Rmb07xRmb29	1.00000	1.00000	1.00000	0.04340	1.00000	0.00208	1.00000	0.00017
Rmb07xRmb40	0.02101	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.00313	1.00000	0.00017
Rmb29xRmb40	1.00000	1.00000	1.00000	0.03212	1.00000	0.01840	0.50694	0.00017

The values represent the probability of genotypic disequilibrium after 5,760 permutations of alleles between individuals. Probability after Bonferroni correction $P = 0.00017$ (95%, $\alpha = 0.05$). * $P < 0.05$.

The strongest LD in IB juveniles may be due to this population occurring in the most intensely fragmented environment. Furthermore, the regenerants were sampled in the area surrounding adult individuals and thus their probable parents and, hence the LD maybe due to the genetic relatedness between juveniles (TAMBARUSSI et al.,

2013; PUPIN et al., 2017). As the deviation from Mendelian inheritance and genetic linkage were detected in only one of the study families and the LD was probably due to the genetic relatedness between juveniles, we can consider all nine loci as good genetic markers. Thus, this suite of nine loci is suited for use in studies of genetic diversity and structure, mating system, and gene flow in *R. montana* var. *brasiliensis* populations.

REFERENCES

- APARECIDO LEO, ROLIM GS, RICHETTI J, SOUZA PS & JOHANN JA. 2016. Köppen, Thornthwaite and Camargo climate classifications for climatic zoning in the State of Paraná, Brazil. *Cienc Agrotec* 40:405–417. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542016404003916>
- BARKER NP, WESTON PH, RUTSCHMANN F & SAUQUET H. 2007. Molecular dating of the ‘Gondwanan’ plant family Proteaceae is only partially congruent with the timing of the break-up of Gondwana. *J Biogeogr* 34(12): 2012–2027.
- DOYLE JJ & DOYLE JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- FALEIRO FG, FALEIRO ASG, CORDEIRO MCR & KARIA CT. 2003. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 5 p.
- FLINT-GARCIA SA, THRONSBERRY JM & BUCLER IV ES. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54:357–374. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134907>
- GILLET E & HATTEMER HH. 1989. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. *Heredity* 63:135–141. <https://doi.org/10.1038/hdy.1989.84>
- GOUDET J. 2002. FSTAT version 2.9.3.2, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Available in <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>> Accessed on 20 August 2017.
- HOOT SB & DOUGLAS AW. 1998. Phylogeny of the Proteaceae based on *atpB* and *atpB-rbcL* intergenic spacer region sequences. *Aust Syst Bot* 11:301–320.
- HOOT S, MAGALLON S & CRANE P. 1999. Phylogeny of basal Eudicots based on three molecular data sets: *AtpB*, *rbcL*, and 18s nuclear ribosomal DNA sequences. *Ann Missouri Bot Gard* 86(1):1–32.
- Hufford KM, Hamrick JL (2003) Viability selection at three early life stages of the tropical tree, *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). *Evolution* 57(3):518–526. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb01543.x>
- KUBOTA TYK, SILVA AM, CAMBUIM J, SILVA AA, PUPIN S, SILVA MS, SILVA MS, MORAES MLT & SEBBENN AM. 2017. Mendelian inheritance, genetic linkage, and genotypic disequilibrium for nine microsatellite loci in *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae). *Genet Mol Res* 16(2):gmr16029653. <https://doi.org/10.4238/gmr16029653>
- LI N, ZHENG YQ, DING HM, LI HP, PENG HZ, JIANG B & LI HB. 2018. Development and validation of SSR markers based on transcriptome sequencing of *Casuarina equisetifolia*. *Trees* 32:41–49. <https://doi.org/10.1007/s00468-017-1607-6>
- LORENZI H. 2008. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Vol.1, 5th edn. São Paulo, Nova Odessa

MANOEL RO, FREITAS MLM, TAMBARUSSI EV, CAMBUIM J, MORAES MLT & SEBBENN AM. 2015. Mendelian inheritance, genetic linkage, and genotypic disequilibrium at microsatellite loci in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Genet Mol Res* 14(3):8161–8167. <https://doi.org/10.4238/2015.July.27.4>

PEREIRA FB, SEBBENN AM, ROSSINI BC, MELCHERT GF, MARINO CL, RIBOLLA PEM, ALONSO DP, SILVA EJV & TAMBARUSSI EV. 2020. Isolation of 27 polymorphic nuclear microsatellite markers for *Roupala montana* var. *brasiliensis* (Proteaceae). *An Acad Bras Ciênc*. Approved 24 August 2020 (in press).

PRANCE G, PLANA V, EDWARDS KS & PENNINGTON R. 2007. Proteaceae. *Flora Neotrop* 100: 211–218.

PUPIN S, ROSSE LN, SOUZA ICG, CAMBUIM J, MARINO CL, MORAES MLT & SEBBENN AM. 2017. Analysis of Mendelian inheritance and genetic linkage in microsatellite loci of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. *Genet Mol Res* 16(3):gmr16039713. <https://doi.org/10.4238/gmr16039713>

SOKAL RR & ROHLF FJ. 1981. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, 2nd edn. New York, W. H. Freeman

TAMBARUSSI EV, VENCOVSKY R, FREITAS MLM & SEBBENN AM. 2013. Mendelian inheritance, genetic linkage, and genotypic disequilibrium at nine microsatellite loci of *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze. *Genet Mol Res* 12(4):5442–5457. <https://doi.org/10.4238/2013.November.11.6>

TARAZI R, SEBBENN AM, MOLLINARI M, VENCOVSKY R. 2010. Mendelian inheritance, linkage and linkage disequilibrium in microsatellite loci of *Copaifera langsdorffii* Desf. *Conserv Genet Res* 2:201–204. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9230-5>

WORLD TIMBERS INC. 2019. Wood database and searchable library: *Roupala brasiliensis*. Available in <
https://www.woodworkerssource.com/online_show_wood.php?wood=Roupala%20brasiliensis>

CAPÍTULO 4
DIVERSIDADE GENÉTICA, SISTEMA REPRODUTIVO E ESTRUTURA GENÉTICA
ESPACIAL EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Roupala montana* var. *brasiliensis*
(KLOTZSCH) K. S. EDWARDS (PROTEACEAE)

Resumo

Roupala montana var. *brasiliensis* (Klotzsch) K.S. Edwards é uma espécie madeireira não-endêmica no Brasil, natural de áreas de Cerrado e Mata Atlântica. Apesar de ter sido explorada comercialmente para substituir madeira de *Cardwellia sublimis* (*Australian lacewood*) no mercado internacional, não há na literatura informações sobre o *status* de conservação das populações naturais, nem aspectos básicos como sistema reprodutivo e estrutura genética espacial, essenciais para o manejo sustentável e determinação de estratégias para conservação da espécie. Dada esta lacuna na literatura, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da fragmentação na diversidade genética e diferenciação entre populações, determinar o sistema reprodutivo e a ocorrência de estruturação genética espacial intrapopulacional para *R. montana* var. *brasiliensis* baseando-se em informações obtidas com o uso de nove locos microssatélites em populações Sul-brasileiras. Este é o primeiro estudo aplicando marcadores moleculares para análise de parâmetros genéticos e reprodutivos em *R. montana* var. *brasiliensis*. A espécie apresenta baixa frequência na floresta e sistema de reprodução preferencialmente alógamo ($t_m \approx 0,83$). Há diversidade genética entre populações, apesar da evidência de endogamia e da perda de riqueza alélica nos estratos mais jovens, o que pode ser um alerta de fragilidade desta diversidade genética detectada nas populações. Dada a estruturação genética significativa observada, recomenda-se a coleta de sementes de 58 árvores espaçadas no mínimo 300 m entre si para conservação e diversidade genética. Além disso, as estimativas do sistema reprodutivo indicaram uma resistência (efeito tampão) aos efeitos da fragmentação severa e da baixa densidade de indivíduos nas populações de *R. montana* var. *brasiliensis*.

Palavras-chave: *Brazilian lacewood*. Carvalho-brasileiro. Marcadores microssatélites. Floresta Ombrófila Mista. Mata Atlântica.

Abstract

Roupala montana var. *brasiliensis* (Klotzsch) K.S. Edwards is a non-endemic timber species in Brazil, native to Cerrado and Atlantic Forest areas. The species was exploited to replace *Cardwellia sublimis* (Australian lacewood) wood on the international market, and no information in the literature is available on the conservation status of natural populations, nor key aspects such as reproductive system and spatial genetic structure, essential for sustainable management and strategy determination for species conservation. Given this gap in the literature, the present study aimed to investigate the effects of fragmentation on genetic diversity and differentiation between populations, to determine the reproductive system and the occurrence of intrapopulation spatial genetic structuring for *R. montana* var. *brasiliensis* based on information obtained with the use of nine microsatellite loci in South-Brazilian populations. This is the first study using molecular markers to analyze genetic and reproductive parameters in *R. montana* var. *brasiliensis*. The species has a low frequency in the forest and a reproductive system, preferably allogamous ($t_m \approx 0.83$). There is genetic diversity among populations, despite evidence of inbreeding and loss of allelic wealth in the younger strata, which may be a warning of the fragility of this genetic diversity detected in populations. Given the significant genetic structure observed, we recommend collecting seeds from 58 trees spaced at least 300 m apart when aiming at conservation and genetic diversity. Also, estimates of the reproductive system indicated resistance (buffer effect) to severe fragmentation and low density of individuals in *R. montana* var. *brasiliensis* populations.

Key-words: Brazilian lacewood. Brazilian oak. microsatellite markers. Mixed Ombrophilous Forest. Atlantic Forest.

4.1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é considerada um dos biomas tropicais mais ameaçados do mundo devido à perda e fragmentação de habitats após cinco séculos de intensa exploração e ocupação humana (MYERS et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2009; PUTTKER et al., 2020). De sua área original, restam menos de 13,1% (FUNDAÇÃO...; INPE, 2019), dos quais apenas 1-2% estão protegidos sob a insígnia legal como unidades de conservação, estando as demais áreas, em sua maioria, distribuídas em fragmentos menores que 50 ha (RIBEIRO et al., 2009). Os efeitos mais imediatos da fragmentação da floresta e da exploração madeireira são a redução do tamanho e densidade populacional (árvores ha⁻¹) e o aumento da distância geográfica entre as populações (YOUNG et al., 2001; LACERDA et al., 2013). Isso tende a resultar na redução da diversidade genética, do tamanho efetivo das populações e do fluxo gênico, bem como no aumento da diferenciação genética entre populações, da estruturação genética espacial e da endogamia (SEBBENN et al., 2011; LACERDA et al. 2013; FORTI et al., 2014; TAMBARUSSI et al., 2015; 2016; VINSON et al., 2018), embora haja algumas exceções a esse padrão esperado (LOWE et al., 2015; CARVALHO et al., 2019).

Fato é que, por ser um bioma muito diversificado em termos de condições ambientais e riqueza de espécies (PERES et al., 2020), muitas espécies da Mata Atlântica ainda permanecem pouco conhecidas, principalmente no que se refere a aspectos sobre os recursos genéticos e *status* de conservação. Um melhor entendimento da genética das espécies florestais é importante, pois pode ajudar a aumentar o sucesso dos programas de reflorestamento e conservação, informar a capacidade das populações naturais de se adaptarem às mudanças ambientais e fornecer subsídios para o uso e manejo sustentável de recursos madeireiros e não madeireiros, bem como para melhoramento genético (DEGEN; SEBBENN, 2014; TAMBARUSSI et al., 2015; ISABEL et al., 2019).

Roupala montana var. *brasiliensis* (Klotzsch) K.S. Edwards, conhecida no mercado internacional de madeira como *Brazilian lacewood* e localmente como carvalho-brasileiro, é uma espécie de árvore Neotropical que ocorre em áreas de Cerrado e Mata Atlântica, do sul da Bahia ao Rio Grande do Sul (LORENZI, 2008). Suas flores são hermafroditas, polinizadas por pequenos insetos e abelhas, e suas sementes são dispersas por gravidade e pelo vento (CARVALHO, 2009; LIEBSCH;

MIKICH, 2009; CAMPOS FILHO; SARTORELLI, 2015). É uma espécie que ocorre em baixas densidades (<1 árvore ha^{-1}), padrão observado para as populações no presente estudo. O carvalho-brasileiro foi explorado até sua escassez como substituto para a madeira de *Cardwellia sublimis* (*Australian lacewood*), quando este, por sua vez, tornou-se escasso na Austrália (WORLD TIMBERS INC., 2019). Com uma madeira de alta qualidade, comparada ao carvalho-europeu, pode ser utilizada em movelaria, e na construção naval e civil, dentre outros usos (PRANCE et al., 2007), o que a torna uma espécie potencial de importância econômica.

Porém, apesar do seu potencial madeireiro e econômico, atrelado à exploração vivenciada e ocorrência em biomas fortemente antropizados, não há na literatura pertinente informações sobre o *status* de conservação genética de suas populações naturais, nem sobre aspectos genéticos básicos para a formulação de estratégias de manejo sustentável e programas de conservação para a espécie. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da fragmentação na diversidade genética e diferenciação entre populações, determinar o sistema reprodutivo e a ocorrência de estruturação genética espacial intrapopulacional para *R. montana* var. *brasiliensis* em populações Sul-brasileiras.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Áreas experimentais

O estudo foi realizado com quatro populações de *R. montana* var. *brasiliensis*, localizada na Região Sul do Brasil, estados do Paraná e Santa Catarina (Tabela 1). Todas as quatro áreas estão inseridas em áreas de Floresta Ombrófila Mista (Figura 1), sob a classe climática Cfb de Koppen (mesotérmica, subtropical úmida, sem estação seca) (APARECIDO et al., 2016). Ao longo de dois anos de monitoramento da fenologia reprodutiva, 2017 e 2018, um único evento reprodutivo foi observado nas populações FI e IB, no ano de 2018, ambas localizadas no município de Fernandes Pinheiro, Estado do Paraná. Os frutos de polinização aberta foram coletados diretamente da copa de três árvores-matrizes em FI, e em quatro árvores-matrizes na população IB. As sementes germinadas variaram de seis a 52 por árvore-matriz, totalizando 161 mudas, das quais coletou-se material foliar para genotipagem.

Também se coletaram folhas de todos os indivíduos adultos (35) e juvenis (305) encontrados nas quatro áreas.

As populações localizadas nas Florestas Nacionais de Irati (FI) e de Três Barras (TB), se encontram inseridas em áreas experimentais de parcelas de inventário permanente, totalizando 25 e 26 ha, respectivamente. De acordo com o zoneamento da FLONA-Irati, a área de estudo está localizada na Zona chamada Primitiva, que por definição é uma área onde houve pequena ou mínima intervenção humana, apresentando alto grau de conservação e estágio avançado de regeneração e, portanto, de grande relevância científica (ICMBio, 2013). Já a população da FLONA-Três Barras, está localizada na Zona de Manejo Florestal de Araucária, em áreas de floresta nativa remanescente (ICMBio, 2016).

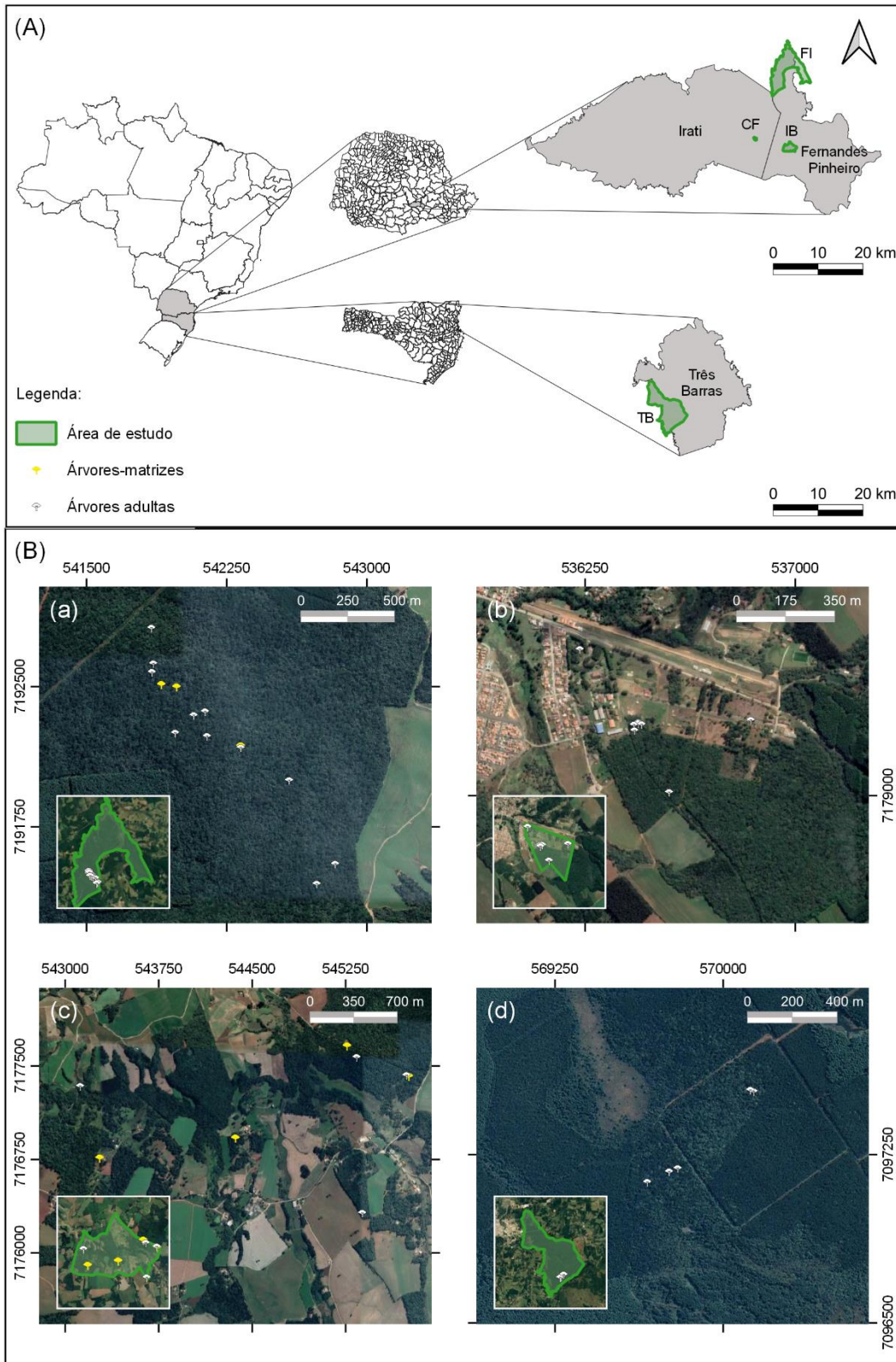
Tabela 1 – Caracterização das populações de *Roupala montana* var. *brasilensis* localizadas em área de Floresta Ombrófila Mista, na região Sul do Brasil

População	N	n_r	n_{st}	n_s	Área (ha)	Densidade (ind ha ⁻¹)	HD	Latitude	Longitude	Localização
FI	14	12	3	35	25	0.56	S/D	25°23'14" S	50°34'45" W	Fernandes Pinheiro, PR
TB	5	15	0	0	26	0.19	S/D	26°12'30" S	50°17'30" W	Três Barras, SC
CF	8	93	0	0	32	0.25	S/D	25°30'20" S	50°38'00" W	Irati, PR
IB	8	185	4	126	400	0.02	Alterada	25°31'20" S	50°33'30" W	Fernandes Pinheiro, PR
Total	35	305	7	161	-	-	-	-	-	-

N : número de indivíduos adultos amostrados; n_r : número total de regenerantes (juvenis) amostrados; n_{st} : árvores-matrizes amostradas em 2018; n_s : número total de mudas obtidas; FI: Floresta Nacional de Irati; TB: Floresta Nacional de Três Barras; CF: Centro Estadual Florestal de Educação Profissional (Cefep) Presidente Costa e Silva; IB: Imituvão; HD: histórico de distúrbios; S/D: áreas consideradas como em condições similares às originais.

A população CF se encontra localizada no capão florestal pertencente ao Centro Estadual Florestal de Educação Profissional (Cefep) “Presidente Costa e Silva”, no município de Irati, Paraná, com área aproximada de 32 ha, que é utilizado didaticamente para ensino de técnicas de inventário florestal.

Figura 1 – Mapa de localização das populações de *Roupala montana* var. *brasilensis* em áreas de Floresta Ombrófila Mista na Região Sul do Brasil (A), e distribuição dos indivíduos adultos nas populações (B) Flona-Irati (FI) (a), bosque do Colégio Florestal (CF) (b), conjunto de fragmentos florestais na comunidade do Imbituvão (IB) (c) e Flona-Três Barras (TB) (d)



A última população, IB, é caracterizada por um conjunto fragmentos de FOM, pertencentes a áreas de Reserva Legal e de Áreas de Preservação Permanente, intercalados com áreas de produção agrícola (≈ 400 ha), em pequenas propriedades rurais familiares que fazem parte do projeto “Estratégias para o manejo florestal sustentável em pequenas propriedades rurais no Centro-Sul do Paraná, Brasil”, conhecido como projeto “Imbituvão”, originado de uma cooperação técnica-financeira entre os Estados do Paraná, Brasil, e de Baden-Württemberg, Alemanha, por meio das Secretarias do Estado da Ciência e Tecnologia e Ensino Superior (SETI) e do Ministério para Ciência, Pesquisa e Artes de Baden-Württemberg.

4.2.2 Extração de DNA e análise de microssatélites

O DNA total genômico foi extraído de folhas de árvores adultas, juvenis e mudas, utilizando o protocolo baseado em Doyle e Doyle (1990) proposto por Faleiro et al. (2003), com modificações. Nove locos microssatélites polimórficos desenvolvidos por Pereira et al. (2020, no prelo) (aqui reproduzido no capítulo 1) foram utilizados neste estudo (Rmb7, Rmb10, Rmb11, Rmb13, Rmb14, Rmb20, Rmb23, Rmb29 e Rmb40), amplificados por PCR seguindo o programa de reação e amplificação descrito por Pereira et al. (2020, no prelo), usando um Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O produto de cada reação de amplificação ($1 \mu\text{L}$) foi separado em um analisador de DNA ABI 3500 (Applied Biosystems), e o software GeneMapper v5 (Applied Biosystems) foi usado para analisar os dados brutos genotípicos.

4.2.3 Análise de diversidade genética

A diversidade genética foi caracterizada para adultos, juvenis e mudas pelo número total de alelos (K), riqueza alélica (R), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg. Também se estimou o índice médio de fixação (F), cuja significância estatística foi testada usando permutação de alelos entre indivíduos, associada à correção de Bonferroni para comparações múltiplas (95%, $\alpha = 0,05$). Todas estas estimativas foram obtidas usando o software FSTAT 1.2 (GOUDET, 2002). Para investigar a diferenciação genética total e pareada entre populações para adultos, juvenis e mudas, calculou-se a medida de diferenciação

genética padronizada $G'_{ST} = \frac{G_{ST}(1+H_s)}{1-H_s}$ (G'_{ST} , HEDRICK, 2005), em que G_{ST} é a diferenciação genética entre populações e H_s é a diversidade genética média dentro de populações (HEDRICK, 2005) estimadas usando o software FSTAT 1.2 (GOUDET, 2002). Para verificação da significância dos parâmetros de diversidade genética entre adultos, juvenis e mudas, dentro e entre populações, aplicou-se um teste de t não pareado (SOKAL; ROHLF, 1981). O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para confirmar a existência de relação entre as distâncias geográficas e a diferenciação genética (G'_{ST}) entre populações.

4.2.4 Coancestria de grupo e tamanho efetivo de variância

A coancestria de grupo (LINDGREN et al., 1997) para adultos e juvenis dentro de populações foi estimada como a média do coeficiente de coancestria entre todos os pares de indivíduos (Θ), baseado no estimador Nason de coancestria (LOISELLE et al., 1995), e no índice de fixação individual (F_i), usando o programa Spagedi 1.3 (HARDY; VEKEMANS, 2002). O tamanho efetivo de variância foi calculado como descrito por Sebbenn (2003):

$$N_e = \frac{0,5}{\Theta \left(\frac{n-1}{n} \right) + \frac{1+\bar{F}_i}{2n}} .$$

4.2.5 Sistema de reprodução

A análise do sistema de reprodução foi baseada nos modelos mistos e correlacionado de cruzamentos, implementados no software MLTR 3.2 (RITLAND, 2002). Estimou-se o índice de fixação das árvores-matrizes (F_m), as taxas de cruzamento multiloco (t_m) e de loco único (t_s), a taxa de endogamia biparental ($t_m - t_s$), a correlação de autofecundação (r_s), e a correlação de paternidade multiloco (r_{pm}) usando os métodos de Newton-Raphson e Maximização da Expectativa (EM) baseada em Máxima Verossimilhança ao nível de população e de árvores-matrizes, respectivamente. O intervalo de confiança a 95% para as estimativas foi obtido a partir da reamostragem de 1000 *bootstraps* (indivíduos dentro de famílias). As proporções de pares de irmãos de autofecundação ($P_{SS} = s^2$), meios-irmãos ($P_{HS} = t_m^2(1 - r_{pm})$), irmãos

completos ($P_{FS} = t_m^2 r_{pm}$), e meios-irmãos e autofecundação ($P_{SHS} = 2st_m$), foram calculadas dentro de famílias e de populações, em que $s = 1 - t_m$ é a taxa de autofecundação (SEBBENN, 2006). A partir destas estimativas, calcularam-se o número efetivo de doadores de pólen ($N_{ep} = 1/r_{pm}$, RITLAND, 1989), o coeficiente de coancestria médio ($\Theta = 0,125(1 + F_m)[4s + (t_m^2 + t_m r_s s)(1 + r_p)]$) e o tamanho efetivo de variância da população (N_{ew})

dentro de família
$$N_{ew} = \frac{0.5}{\Theta \left(\frac{n-1}{n} \right) + \frac{1+F_o}{2n}}$$
, em que n é o tamanho amostral e F_o é o

coeficiente de endogamia dentro de família, estimado a partir do índice de fixação (SEBBENN, 2006). O número de árvores-matrizes para coleta de sementes foi estimado como $m = N_{er} / N_e$, considerando um tamanho efetivo de referência (N_{er}) igual a 150 (SEBBENN, 2006).

4.2.6 Estrutura genética espacial

A ocorrência de estrutura genética espacial (EGE) para adultos e juvenis em cada população foi estimada a partir do coeficiente de coancestria pareado (θ_{ij}) (LOISELLE et al., 1995) dentro de diferentes classes de distância, usando o software SPAGEDI 1.5 (HARDY; VEKEMANS, 2002). O θ_{ij} foi classificado em quatro classes de distância para as populações FI (0–200, 200–400, 400–700, e 700–1632 m) e TB (0–15, 15–105, 105–481, e 481–636 m), e em sete classes para as populações CF (0–5, 5–10, 10–25, 25–50, 50–150, 150–300, e 300–600 m) e IB (0–5, 5–10, 10–25, 25–50, 50–150, 150–300, e 300–2,700 m). O θ_{ij} médio pareado foi plotado contra a distância geográfica, e a significância estatística desta media para cada classe de distância foi obtida comparando os limites do intervalos de confiança a 95% do θ_{ij} médio, obtidos pela permutação de 1000 indivíduos entre classes, para a hipótese nula de ausência de EGE ($\theta_{ij} = 0$). Para comparar a EGE entre populações, estimou-se o s_p (VEKEMANS; HARDY, 2004) como $-b_k/(1-\theta_1)$, em que θ_1 é o coeficiente de coancestria pareado médio calculado entre indivíduos dentro da primeira classe de distância e b_k é a inclinação da curva de regressão do coeficiente de coancestria com o logaritmo da distância total avaliada em cada população. Para testar a EGE, a

posição especial dos indivíduos foi permutada 1000 vezes para obtenção da frequência de distribuição de b_k sob a hipótese nula (ausência de correlação).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Diversidade genética

Observou-se um total de 143 alelos (K) para todos os indivíduos, adultos, juvenis e mudas, amostrados (Tabela 2). Um total de apenas 14 alelos privados (9,8% do total) foi observado: três para FI, dois para TB, cinco para CF e quatro para população IB. Destes alelos privados, para a população TB não se observou alelos privados entre estratos (adultos e juvenis); para as demais populações, um único alelo privado foi exclusivo para adultos na população FI e para juvenis das populações CF e IB.

A heterozigosidade observada (H_o) significativamente menor em relação à esperada (H_e) para população FI resultou num índice de fixação significativamente maior do que zero para adultos ($F = 0,139$) e juvenis ($0,181$), e em mudas da população IB ($F = 0,165$), indicando endogamia. O teste t não-pareado (g.l. = 8) não indicou diferenças significativas para as médias dos índices de diversidade genética entre populações, nem dentro de estrato (P mínimo: 0,7 para adultos, 0,64 para juvenis, e 0,81 para mudas), ou para estratos agrupados (P mínimo: 0,69 para A+J, e 0,95 para A+J+S). Também não foram observadas diferenças entre estratos dentro de populações (A vs. J, J vs. S, A vs. S), com P mínimo de 0,75.

O coeficiente de correlação de Spearman ($\rho = 0,805$, $P = 0,005$) indicou uma correlação positiva entre o número total de alelos e o tamanho da amostra. Para contornar este viés e comparar a riqueza alélica (R) entre populações dentro de estratos (Tabela 2) e entre estratos dentro de populações (Tabela 3), esta foi estimada a partir de amostras balanceadas. A R média foi similar entre populações dentro dos estratos adulto (5,5–6,6), juvenil (5,5–7,2), e mudas (8–8,6) (Tabela 2). Entretanto, para população FI, a área mais conservada, o valor de R reduziu do estrato adulto (9,2 e 11,1) para os mais jovens (mudas = 6,9 e juvenis = 7,2) (Tabela 3).

Tabela 2 – Diversidade e diferenciação (G'_{ST}) genéticas, e índice de fixação (F) entre adultos, juvenis e mudas de quatro populações de *Roupala montana* var. *brasiliensis*: Flona-Irati (FI), Flona-Três Barras (TB), Colégio Florestal (CF) e Imbituvão (IB)

	n	K	R (1.96SE)	H_o (1.96SE)	H_e (1.96SE)	F (1.96SE)	G'_{ST} (1.96SE)
Adultos (A)							0,393 (0,179)*
FI	14	100	6,6 (1,0) ^a	0,770 (0,121)	0,894 (0,035)	0,139 (0,153)*	
TB	5	56	6,2 (1,6) ^a	0,778 (0,138)	0,886 (0,074)	0,122 (0,143)	
CF	8	64	5,5 (1,2) ^a	0,831 (0,081)	0,802 (0,077)	-0,037 (0,086)	
IB	8	72	6,1 (1,4) ^a	0,875 (0,071)	0,851 (0,053)	-0,028 (0,073)	
Juvenis (J)							0,761 (0,169)*
FI	12	70	7,2 (1,0) ^b	0,685 (0,113)	0,836 (0,023)	0,181 (0,130)*	
TB	15	56	5,5 (1,0) ^b	0,698 (0,102)	0,764 (0,061)	0,086 (0,106)	
CF	93	104	6,0 (1,4) ^b	0,751 (0,104)	0,731 (0,101)	-0,027 (0,028)	
IB	185	117	6,5 (1,4) ^b	0,773 (0,081)	0,786 (0,062)	0,017 (0,043)	
Mudas (S)							0,451 (0,162)*
FI	35	76	8,0 (1,2) ^c	0,790 (0,074)	0,804 (0,034)	0,021 (0,065)	
IB	126	108	8,6 (2,5) ^c	0,671 (0,098)	0,799 (0,099)	0,165 (0,056)*	
A+J							0,714 (0,164)*
FI	26	106	10,3 (1,4) ^d	0,731 (0,102)	0,869 (0,030)	0,159 (0,126)*	
TB	20	64	6,8 (1,0) ^d	0,718 (0,093)	0,785 (0,053)	0,086 (0,094)	
CF	101	106	7,4 (1,0) ^d	0,757 (0,098)	0,735 (0,097)	-0,030 (0,027)	
IB	193	117	7,8 (1,3) ^d	0,777 (0,079)	0,788 (0,061)	0,013 (0,040)	
A+J+S							0,278 (0,138)*
FI	61	113	12,2 (1,8) ^e	0,764 (0,063)	0,831 (0,035)	0,081 (0,060)	
IB	319	125	10,5 (1,9) ^e	0,736 (0,080)	0,803 (0,056)	0,084 (0,048)	
Total	501	143	-	0,742 (0,063)	0,839 (0,049)	0,115 (0,035)	

n é o tamanho amostral; K é o número total de alelos; R é a riqueza alélica para 5 (a), 9 (b), 26 (c), 16 (d), e 49 (e) genótipos, respectivamente; H_o e H_e são as heterozigosidade observada e esperada; F é o índice de fixação; * $P \leq 0.00069$ após correção de Bonferroni para comparações múltiplas. SE é o erro padrão da média

Tabela 3 – Riqueza alélica (R) entre adultos, juvenis e mudas, de quatro populações de *Roupala montana* var. *brasiliensis*: Flona-Irati (FI), Flona-Três Barras (TB), Colégio Florestal (CF) e Imbituvão (IB)

		R (1.96SE)		
	Número de genótipos comparados	Adultos	Juvenis	Mudas
FI	9	9,2 (1,2) ^a	7,2 (0,7) ^b	6,0 (0,5) ^a
TB	5	6,2 (1,1) ^a	4,6 (0,5) ^a	-
CF	7	6,7 (1,0) ^a	5,4 (0,8) ^a	-
IB	8	8,0 (1,5) ^a	6,2 (0,9) ^a	5,9 (1,1) ^a
FI	9	9,2 (1,2) ^a	7,2 (0,7) ^b	-
FI	14	11,1 (1,7) ^a	-	6,9 (0,6) ^b
FI	9	-	7,2 (0,7) ^a	6,0 (0,5) ^a
IB	8	8,0 (1,5) ^a	6,2 (0,9) ^a	-
IB	8	8,0 (1,5) ^a	-	5,9 (1,1) ^a
IB	106	-	11,8 (2,3) ^a	11,7 (2,3) ^a

Letras iguais na mesma linha indicam medias estatisticamente iguais, ao nível de 95%. SE é o erro padrão da média.

Apesar do resultado do teste *t* não-pareado, os valores de G'_{ST} indicaram, por sua vez, diferenciação genética significativa entre populações dentro de estratos ($G'_{ST} = 0,393 \pm 0,179$ para adultos; $0,761 \pm 0,169$ para juvenis; $0,451 \pm 0,162$ para mudas) e para estratos agrupados ($G'_{ST} = 0,714 \pm 0,164$ para A+J; $0,278 \pm 0,138$ para A+J+S) (Tabela 2). O coeficiente de correlação de Spearman (ρ) entre as distâncias geográficas e as divergências genéticas (G'_{ST}) entre populações foi igual a $-0,429$ ($P = 0,396$) para adultos, $0,886$ ($P = 0,019$) para juvenis e $0,6$ ($P = 0,208$) para adultos e juvenis agrupados (Tabela 4), indicando uma relação positiva e significativa apenas para o estrato juvenil.

Tabela 4 – Distâncias geográficas (km) entre áreas de estudo e divergência genética (G'_{ST}) entre populações de *Roupala montana* var. *brasiliensis*: Flona-Irati (FI), Flona-Três Barras (TB), Colégio Florestal (CF) e Imbituvão (IB)

Áreas	Distância (km)	Adultos (A)	Juvenis (J)	Mudas (S)	A+J	A+J+S
FI x TB	95	0,087	0,662	-	0,539	-
FI x CF	14	0,333	0,472	-	0,453	-
FI x IB	15	0,03	0,445	0,451	0,266	0,278
TB x CF	85	0,371	0,601	-	0,587	-
TB x IB	81	0,309	0,623	-	0,593	-
CF x IB	8	0,378	0,275	-	0,444	-

4.3.2 Tamanho efetivo de população

A média do coeficiente de coancestria de grupo (Θ) entre todos os pares de árvores adultas variou de 0,021 (FI) a 0,106 (TB); para juvenis, esta estimativa variou de 0,003 (IB) a 0,039 (FI), e, considerando todos os indivíduos amostrados dentro de cada área, esta variação foi entre 0,003 (IB) a 0,023 (TB) (Tabela 5). O tamanho efetivo de população reprodutiva (N_e/N) estimado indica uma taxa entre 0,52 (TB) a 0,69 (IB) de árvores adultas não aparentadas e não-endogâmicas. Para o estrato juvenil, de modo geral, esta proporção decresce, variando de 0,49 (FI) a 0,55 (TB). Entretanto, para população TB, observou-se uma proporção de indivíduos não aparentados e não-endogâmicos maior nos juvenis do que nos adultos.

Tabela 5 – Resultados da média do coeficiente de coancestria de grupo (Θ), tamanho efetivo de população (N_e) e relação entre N_e/N em quatro populações de *Roupala montana* var. *brasilensis*: Flona-Irati (FI), Flona-Três Barras (TB), Colégio Florestal (CF) e Imbituvão (IB)

	N	F	Θ	N_e	N_e/N
FI					
Adultos (A)	14	0,143	0,021	8,2	0,59
Juvenis (J)	12	0,172	0,039	5,9	0,49
A+J	26	0,157	0,016	13,4	0,51
TB					
Adultos (A)	5	0,095	0,106	2,6	0,52
Juvenis (J)	15	0,074	0,026	8,3	0,55
A+J	20	0,079	0,023	10,2	0,51
CF					
Adultos (A)	8	-0,058	0,042	5,2	0,65
Juvenis (J)	93	-0,029	0,005	47,5	0,51
A+J	101	-0,031	0,005	50,8	0,50
IB					
Adultos (A)	8	-0,060	0,037	5,5	0,69
Juvenis (J)	185	0,015	0,003	93,9	0,51
A+J	193	0,012	0,003	97,4	0,50

N é o tamanho da amostra; F é o índice de fixação para população (valores negativos foram assumidos como zero na estimativa de N_e)

4.3.3 Sistema reprodutivo

O índice de fixação para árvores-matrizes médio (FI: $F_m = -0,20$, variação entre famílias: $-0,28$ a $0,05$; IB: $F_m = -0,14$, variação entre famílias: $-0,11$ a $0,18$) não diferiu significativamente de zero para ambas as populações avaliadas, indicando que as árvores-matrizes não são endogâmicas (Tabela 6). Entretanto, para a população IB, como esperado dado o resultado obtido a partir do FSTAT, a média do índice de fixação de progênies (F_o) foi significativamente maior do que zero ($F_o = 0,165$, variação entre famílias: $0,07$ a $0,18$), sugerindo que há mudas endogâmicas.

Tabela 6 – Índices do sistema de reprodução em duas populações de *Roupala montana* var. *brasiliensis*

Índices	Flona-Irati (FI): média (1.96SE)				Imbituvão (IB): média (1.96SE)				
	M2	M4	M8	Total	M1	M25	M68	M69	Total
Número de sementes (n_s)	7	7	21	35	22	6	46	52	126
Índice de fixação das árvores-matrizes (F_m)	0,01	0,05	-0,28	-0,2	-0,07	0,18	-0,11	-0,07	-0,14
Índice de fixação das progênies (F_o)	0	0,05	0,06	0,02	0,15	0,07	0,17	0,18	0,16
Taxa de cruzamento multiloco (t_m)	1,0 (0,01)	0,72 (0,17)	0,81 (0,09)	0,83 (0,01)	0,91 (0,06)	0,98 (0,01)	0,81 (0,13)	0,77 (0,12)	0,82 (0,01)
Endogamia biparental ($t_m - t_s$)	0,01 (0,01)	-0,03 (0,17)	-0,19 (0,09)	-0,12 (0,01)	0,08 (0,05)	0,1 (0,08)	0,03 (0,12)	0,04 (0,11)	0,05 (0,01)
Correlação de autofecundação (r_s)	-	-	-	0,03 (0,05)	-	-	-	-	0,03 (0,01)
Correlação de paternidade multiloco (r_{pm})	0,23 (0,16)	0,07 (0,10)	0,06 (0,03)	0,09 (0,02)	0,16 (0,07)	0,1 (0,02)	0,09 (0,04)	0,05 (0,02)	0,09 (0,01)
Número de doares de pólen (N_{ep})	4,3	13,9	17,9	11,8	6,4	10,4	10,6	19,6	10,9
Proporção de filhos de autofecundação (P_{SS})	0	0,08	0,04	0,03	0,01	0,01	0,03	0,05	0,03
Proporção de meios-irmãos (P_{HS})	0,77	0,47	0,62	0,63	0,70	0,86	0,60	0,56	0,61
Proporção de irmãos completos (P_{FS})	0,23	0,04	0,04	0,06	0,13	0,09	0,06	0,03	0,06
Proporção de meios-irmãos de autofecundação (P_{SHS})	0	0,41	0,31	0,28	0,17	0,03	0,30	0,36	0,29
Coeficiente de coancestria (Θ)	0,154	0,221	0,182	0,179	0,165	0,167	0,184	0,193	0,182
Tamanho efetivo de população (N_e)	2,4	1,9	2,5	2,6	2,7	2,2	2,6	2,5	2,6
Número de árvores-matrizes para coleta (m)	-	-	-	59	-	-	-	-	58

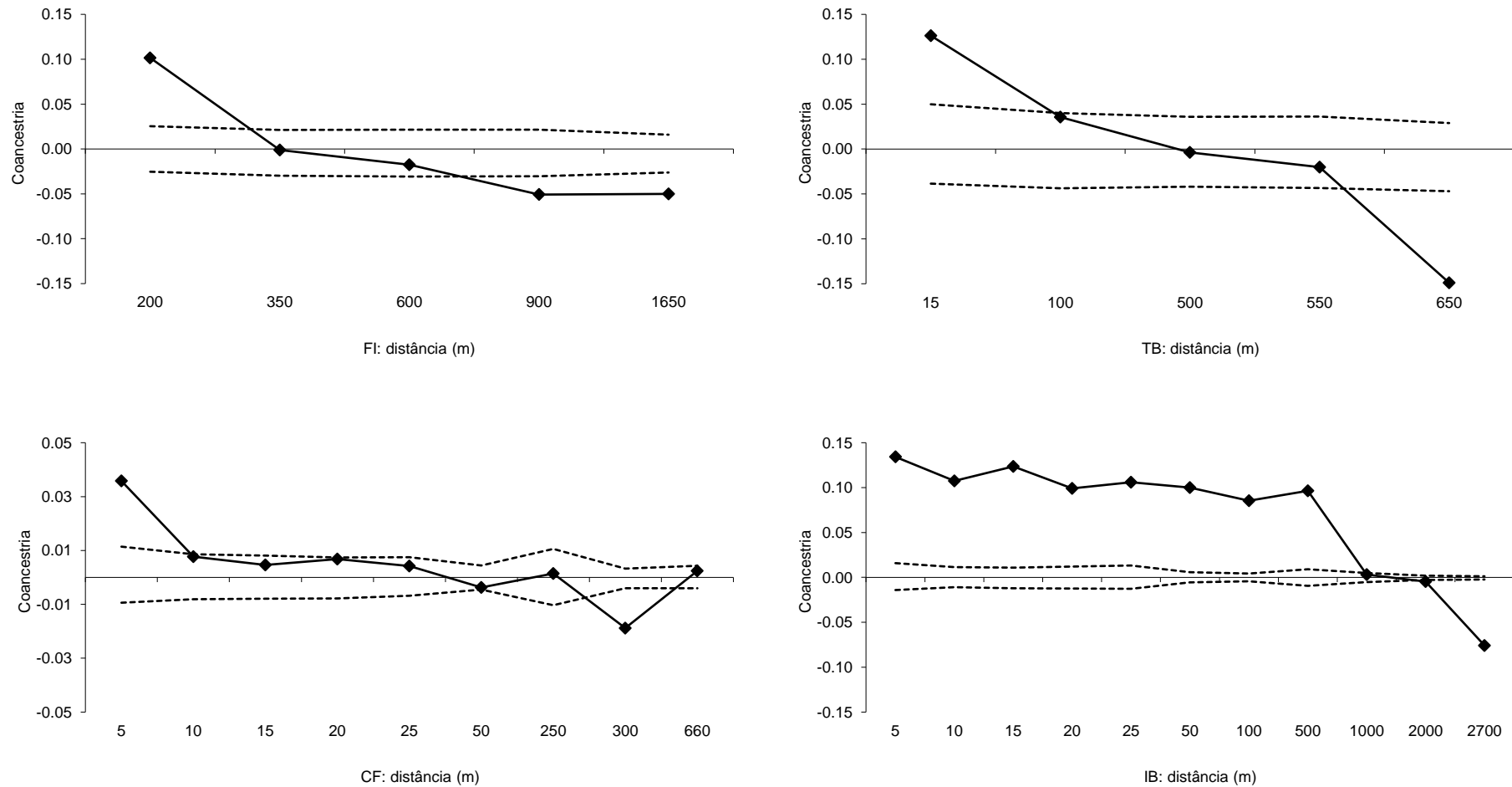
SE é o erro padrão da média

A taxa de cruzamento multiloco (t_m) para ambas as populações FI ($t_m = 0,83$, variação entre famílias: 0,72 a 1) e IB ($t_m = 0,82$, variação entre famílias: 0,77 a 0,98) foram significativamente menores que a unidade, mas não distintas entre si (Tabela 6), indicando a ocorrência de autopolinização nas duas populações, apesar da diferença de histórico de conservação e paisagem (Figura 1). A taxa de endogamia biparental ($t_m - t_s$) foi maior que zero para população IB ($t_m - t_s = 0,05 \pm 0,01$), em apenas duas de suas famílias amostradas (M1 e M25), sugerindo a ocorrência de endogamia a partir de cruzamentos entre indivíduos aparentados. As correlações de paternidade multiloco (FI: $r_{pm} = 0,09$, variação entre famílias: 0,06–0,23; IB: $r_{pm} = 0,09$, variação entre famílias: 0,05–0,16) foram significativamente maiores do que zero, indicando a ocorrência de irmãos-completos dentro das famílias. O número médio de doadores de pólen efetivos por árvore-matriz foi similar entre as populações (FI: $N_{ep} = 11,8$, variação entre famílias: 4,3–17,9; IB: $N_{ep} = 10,9$, variação entre famílias: 6,4–19,6). O coeficiente médio de coanscestria dentro de famílias (FI: $\Theta = 0,179$, variação entre famílias: 0,154–0,221; IB: $\Theta = 0,182$, variação entre famílias: 0,165–0,193) foi significativamente maior do que o esperado para famílias de meios-irmãos, enquanto o tamanho médio efetivo de população dentro de famílias (FI: $N_e = 2,6$, variação entre famílias: 1,9–2,5; IB: $N_e = 2,6$, variação entre famílias: 2,2–2,7) foi menor do que o esperado nas mesmas condições. O número de árvores-matrizes para coleta de sementes visando a retenção de um tamanho efetivo de referência de 150 (m) para amostras de polinização-aberta foi de 59 árvores para a população FI e 58 para a população IB.

4.3.4 Estrutura genética especial (EGE)

A EGE para adultos e juvenis de cada uma das quatro populações em estudo foi significativamente maior que zero em todas as populações, variando de 5 a 300 m (Figura 2).

Figura 2 – Correlogramas do coeficiente de coancestria médio (θ_{ij}) de árvores adultas e juvenis de *Roupala montana* var. *brasiliensis* das populações da Flona-Irati (FI), Flona-Três Barras (TB), Colégio Florestal (CF) e Imbituvão (IB)



A linha contínua representa o valor médio; as linhas tracejadas representam o intervalo de confiança de 95% (bicaudal) da distribuição média calculada por 1000 permutações da distância entre pares de plantas individuais. Círculos completos significam valores significativamente diferentes de zero.

O valor médio de θ_1 para todos os pares de adultos e juvenis dentro da faixa de distância total considerada por população foi significativo, variando de 0,036 (CF) a 0,134 (IB). A inclinação da regressão (b_k) dos coeficientes de coancestria pareados com a distância especial logarítmica foi significativamente negativo para todas as populações (Tabela 7), sugerindo um padrão de isolamento por distância nas populações. A intensidade da EGE, medida por S_p , foi similar entre as populações FI, TB, e IB, com S_p de 0,06, 0,056, e 0,043, respectivamente, mas estatisticamente menor para população CF ($S_p = 0,007$).

Tabela 7 – Estimativas de parâmetros de estrutura genética espacial (EGE) para adultos e juvenis de *Roupala montana* var. *brasiliensis*

População	Intervalo de distância (m)	θ_1	b_k	S_p (1.96SE)
FI	0 – 1,632	0.101*	-0.054***	0.060 (0.002)*
TB	0 – 636	0.126*	-0.049***	0.056 (0.018)*
CF	0 – 660	0.036*	-0.007***	0.007(0.002)*
IB	0 – 2,700	0.134*	-0.038***	0.043 (0.009)*

* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. θ_1 é o coeficiente de coancestria no intervalo de distância; b_k é a inclinação da regressão do coeficiente de coancestria no logaritmo da distância entre indivíduos; S_p é a estatística que mede a extensão da EGE no intervalo de distância; SE é o erro padrão da média. FI: Flona Irati; TB: Flona Três Barras; CF: Colégio Florestal; IB: Imbituvão.

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Diversidade genética e endogamia

Este é o primeiro estudo aplicando marcadores moleculares para análise de diversidade genética, endogamia, tamanho efetivo e sistema reprodutivo de *R. montana* var. *brasiliensis*, inclusive considerando as demais espécies do gênero. Os resultados observados neste estudo geram informações relevantes para uso no planejamento e desenvolvimento de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*, bem como para programas de melhoramento de *R. montana* var. *brasiliensis*. A primeira destas é a correção da informação que a literatura mais clássica (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2008) reporta, de que o carvalho-brasileiro é uma espécie de ocorrência comum na floresta, com alta densidade de indivíduos; na verdade, a espécie

apresentou baixa frequência (<1 indivíduo ha^{-1}) em todos os fragmentos florestais estudados, dos mais antropizados aos mais conservados.

As populações estudadas apresentam nível de diversidade intrapopulacional similares, embora sejam geneticamente distintas entre si, o que corrobora como indicativo do processo de isolamento por distância observado a partir das estimativas de EGE. Além disso, as áreas localizadas em espaços intensamente antropizados (CF, em ambiente urbano, e IB, em “mosaico rural”), não apresentaram uma riqueza alélica distinta entre adultos e estratos mais jovens, enquanto na maior e mais conservada das áreas de estudo, a Flona-Irati (FI), a riqueza alélica de mudas e juvenis foi inferior ao observado para os adultos. Esse resultado é o oposto do esperado para paisagens formadas por fragmentos pequenos e isolados: diminuição da diversidade genética e do tamanho efetivo da população, com um aumento da endogamia (SEBBENN et al., 2011; FORTI et al., 2014; VISON et al., 2018). De fato, com base no valor do índice de fixação (F), observa-se a evidência de ocorrência de endogamia na população FI, indicada pelo excesso de homozigotos dado pelo índice de fixação estatisticamente maior que zero ($F = 0,139$ para adultos e $0,181$ para juvenis).

O valor de F também significativamente maior que zero para as mudas obtidas das sementes coletadas na área IB ($F = 0,165$), mas não significativo para juvenis e adultos estabelecidos na floresta, sugere que pode estar ocorrendo a seleção contra indivíduos aparentados nos estágios iniciais de vida de *R. montana* var. *brasiliensis*, durante seu desenvolvimento na floresta (OLIVEIRA et al., 2020). As correlações de paternidade significativas confirmam a ocorrência de tais indivíduos aparentados dentro de famílias.

A evidência de endogamia nas mudas provenientes da população IB pode ser associada à ocorrência significativa de endogamia biparental ($t_m - t_s$), o que reflete os tamanhos efetivos das populações reprodutivas (N_e / N) de no máximo 70% de indivíduos adultos não aparentados e não-endogâmicas. Estes resultados indicam que os cruzamentos não estão ocorrendo de forma aleatória, bem como demonstram a existência de diferentes níveis de parentesco dentro das famílias de polinização aberta (meios-irmãos, irmãos completos, irmãos de autofecundação) além do que é esperado em condições ideais (meios-irmãos), resultado reiterado pelas proporções calculadas para estes níveis de parentesco (P_{HS} , P_{FS} , P_{SHS} e P_{SS}). Oliveira et al. (2020)

observaram um resultado semelhante para *Swietenia macrophylla*, uma espécie amazônica, comparando juvenis e adultos em uma população natural.

No entanto, espécies de árvores em áreas tropicais tendem a apresentar maior depressão por endogamia nos estágios iniciais da vida, de sementes a juvenis (TAMBARUSSI et al., 2017; PUPIM et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020), e este aumento da endogamia nas novas gerações (juvenis e mudas) pode se tornar um problema para a manutenção da população em uma paisagem fragmentada, visto que tende a gerar menor vigor de reprodução e heterozigosidade (FORTI et al., 2014). Nesse sentido, a riqueza alélica maior em adultos do que em plântulas e juvenis para a população FI acende um sinal vermelho: embora o nível mais alto de endogamia detectado em estratos jovens possa ser mitigado pela seleção ao longo do tempo, eliminando-se indivíduos endogâmicos, a perda de alelos é um sinal de suscetibilidade da diversidade genética da espécie (OLIVEIRA et al., 2020), e pode ser explicado por processos como deriva genética e/ou efeitos de amostragem não-aleatória nos cruzamentos em função do pequeno número de adultos reprodutivos (TAMBARUSSI et al., 2016).

4.4.2 Sistema reprodutivo

Em populações naturais, espera-se que a fragmentação do habitat diminua significativamente a polinização e a reprodução por cruzamentos, em função da redução no serviço de polinização como um impacto das atividades humanas, e devido aos bem conhecidos efeitos da fragmentação, que são o isolamento e redução do tamanho populacional (AGUILAR et al., 2006; AGUIRRE-ACOSTA et al., 2014). Apesar das diferenças entre as condições de conservação das áreas FI e IB, a taxa de cruzamento (t_m) foi alta e estatisticamente igual ($\approx 0,83$), indicando predomínio de alogamia. Isto indica que a expectativa de uma redução proporcional significativa da ocorrência de cruzamentos com um aumento potencial de autofecundações em habitats perturbados, com baixa densidade de árvores florescidas (ECKERT et al., 2010; VINSON et al., 2018) não foi corroborada por nossos resultados.

A variação observada para t_m entre árvores-matrizes dentro e entre populações (FI: 0,72 a 1; IB: 0,77 a 0,98) pode ser uma evidência da presença de mecanismos de autoincompatibilidade gametofítica parcial na espécie, muito comum em espécies de

plantas (ABDALLAH et al., 2019; CLAESSEN et al., 2019), garantindo a reprodução em um cenário de pólen limitado, como por pequena densidade de plantas reprodutivas e/ou polinizadores (DORNIER et al., 2008). Em *Roupala montana* Aubl. foi observado indícios de mecanismo de autoincompatibilidade, a partir de estudos de morfologia floral (OLIVEIRA; GIBBS, 2000). A hipótese de autoincompatibilidade parcial é levantada pela taxa de cruzamento estatisticamente distinta da unidade, somada ao fato de que receptividade do estigma da flor dura o dia todo, enquanto o pólen é liberado quando a flor ainda se encontra fechada, por meio de fendas longitudinais, projetadas para o interior da mesma na direção do pistilo (HOMCZINSKI, I., 2018, comunicação pessoal). O número de árvores necessárias para manter um tamanho efetivo de referência de 150 resultou similar para ambas as populações (FI: 59; IB: 58), valor este consistente com o observado para outras espécies de árvores neotropicais (DEGEN; SEBBENN, 2014; MANOEL et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2020).

Desde modo, ao contrário do que se esperava devido à divergência de paisagens (conservadas vs. intensamente fragmentadas) em que estão inseridas as populações estudadas, o tamanho populacional e a diversidade genética não resultaram divergentes. Apesar da redução da riqueza alélica na maior e mais conservada população, bem como a evidência de endogamia em juvenis e mudas, as estimativas do sistema reprodutivo indicaram uma resistência (efeito tampão) aos efeitos da fragmentação severa e da baixa densidade de indivíduos (BREED et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2020) nas populações de *R. montana* var. *brasiliensis*.

4.4.3 Estrutura genética espacial (EGE)

Considerando adultos e juvenis, observou-se EGE significativa até 5 m, 15 m, 192 m e 300 m para as populações CF, TB, FI e IB, sugerindo que os indivíduos encontrados dentro dessas distâncias apresentam maior probabilidade de serem aparentados. A intensidade da EGE foi semelhante para FI, TB e IB, apesar da diferença de escala. Como *R. montana* var. *brasiliensis* apresenta sementes dispersas pela gravidade e pelo vento, estas geralmente caem perto da árvore mãe, o que explica as curtas distâncias da EGE na população de TB e CF, tal qual observado para *Esenckia leiocarpa*, outra espécie da Mata Atlântica polinizada por pequenos insetos (FORTI et al., 2014).

A maior distância de EGE observada para a população da Flona de Irati (FI), considerando a outra Flona (TB), pode ser um efeito de amostragem associado a menor proporção de regeneração observada no entorno das árvores adultas em FI do que em TB. Em IB, a estruturação genética observada a maiores distâncias pode ser explicada por um fluxo de pólen migrante na população, causado por um forrageamento a maiores distâncias, dado o habitats fragmentado, por parte dos polinizadores, o que já foi relatado na literatura (FUCKS; HAMRICK, 2011). No entanto, todas as populações parecem estar isoladas por distância. Este fato pode ser o responsável pela baixa riqueza alélica em juvenis e sementes, bem como no aparente insucesso reprodutivo observado na população FI.

Baseado nisso, devido aos níveis de endogamia, tamanho efetivo menor do que o esperado, associado à ocorrência de cruzamentos não-aleatórios, presença de EGE significativa, e evidência de dispersão de sementes a curtas distâncias, recomendado coletar sementes de ao menos 58 indivíduos para aumentar a diversidade genética e o tamanho efetivo de variância das progênies amostradas para conservação e melhoramento *ex situ*. Além disso, as sementes devem ser coletadas de árvores com espaçamento de no mínimo 300 m entre si, para evitar a coleta de sementes de árvores aparentadas e reduzir a probabilidade de *pools* de pólen sobrepostos.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, D.; BARAKET, G.; PEREZ, V.; MUSTAPHA, S. B.; SALHI-HANNACHI, A.; HORMAZA, J. I. Analysis of self-incompatibility and genetic diversity in diploid and hexaploid plum genotypes. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 10, 896, 2019.
- AGUILAR, R.; ASHWORTH, L.; GALETTO, L.; AIZEN, M. A. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. **Ecology Letters**, [s.l.], v. 9, n. 8, p. 968-980, 2006
- APARECIDO, L. E. O.; ROLIM, G. S.; RICHETTI, J.; SOUZA, P. S.; JOHANN, J. A. Köppen, Thornthwaite and Camargo climate classifications for climatic zoning in the State of Paraná, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 4, p. 405-417, 2016.
- AGUIRRE-ACOSTA, N.; KOWALJOW, E.; AGUILAR, R. Reproductive performance of the invasive tree *Ligustrum lucidum* in a subtropical dry forest: does habitat fragmentation boost or limit invasion?. **Biological Invasions**, [s.l.], v. 16, p. 1397-1410 2014.
- BREED, M.; OTTEWELL, K.; GARDNER, M.; MARKLUND, M. H. K.; STEAD, M. G.; HARRIS, J. B. C.; LOWE, A. J. Mating system and early viability resistance to habitat fragmentation in a bird-pollinated eucalypt. **Heredity**, [s.l.], v. 115, p. 100–107, 2015.
- CAMPOS FILHO, E. M.; SARTORELLI, P. A. R. **Guia de identificação de espécies-chave para a restauração florestal na região do Alto Teles Pires, Mato Grosso**. São Paulo: The Nature Conservancy, 2015.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p. (v. 1)
- CARVALHO, P. E. R. **Carvalho-do-Cerrado: *Roupala montana***. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2009. 8 p. (Comunicado Técnico, n. 223).
- CARVALHO, C. S.; LANES, E. C. M.; SILVA, A. R.; CALDEIRA, C. F.; CARVALHO-FILHO, N.; GASTAUER, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NASCIMENTO JÚNIOR, W.; OLIVEIRA, G.; SIQUEIRA, J. O.; VIANA, P. L.; JAFFÉ, R. Habitat loss does not always entail negative genetic consequences. **Frontiers in Genetics**, [s.l.], v. 10, 1011, 2019.
- CLAESSEN, H.; KEULEMANS, W.; POEL, B. V.; STORME, N. Finding a compatible partner: self-incompatibility in European pear (*Pyrus communis*); molecular control, genetic determination, and impact on fertilization and fruit set. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 10, 407, 2019.
- DEGEN, B.; SEBBENN, A. M. Genetics and tropical forest. In: PANCEL, L.; KOHL, M. **Tropical Forest Handbook**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. p. 1-30.
- DORNIER, A.; MUNOZ, F.; CHEPTOU, P.O. Allee effect and self-fertilization in hermaphrodites: reproductive assurance in a structured metapopulation. **Evolution**, [s.l.], v. 62, n. 10, p. 2558-2569, 2008.

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

ECKERT, C. G.; KALISZ, S.; GEBER, M. A.; SARGENT, R.; ELLE, E.; CHEPTOU, P.O.; et al.; WINN, A. A. Plant mating systems in a changing world. **Trends in Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 25, n.1, p. 35-43, 2010.

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando análises moleculares**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2003, 5 p. (**Comunicado Técnico**, 92).

FORTI, G.; TAMBARUSSI, E. V.; KAGEYAMA, P. Y.; MORENO, M A.; FERRAS, E. M.; IBÁÑEZ, B.; MORI, G. M.; VENCOVSKY, R.; SEBBENN, A. M. Low genetic diversity and intrapopulation spatial genetic structure of the Atlantic Forest tree, *Esenkia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Annals of Forest Research**, [s.l.], v. 57, n. 2, p. 165-174, 2014.

FUCKS, E. J.; HAMRICK, J. L. Mating system and pollen flow between remnant populations of the endangered tropical tree, *Guaiaecum sanctum* (Zygophyllaceae). **Conservation Genetics**, [s.l.], v. 12, p. 175-185, 2011.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - INPE. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata atlântica – Período 2017-2018**. 2019. (Relatório Técnico). Disponível em: https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2019/05/Atlas-mata-atlantica_17-18.pdf. Acesso em: 24 abr. 2020.

GOUDET, J. **FSTAT 2.9.3.2.: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices**. 2002. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Acesso em: 05 jan. 2021.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 618-620, 2002.

HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, [s.l.], v. 59, n. 8, p. 1633-1638, 2005.

INSTITUTO CHICO MENDES DE BIODIVERSIDADE. **Plano de manejo da Floresta Nacional de Irati**. 2013. 66 p. (v. 2). Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-planos-de-manejo/flona_irati_vol2_pm.pdf. Acesso em: 24 nov. 2020.

INSTITUTO CHICO MENDES DE BIODIVERSIDADE. **Plano de manejo da Floresta Nacional de Três Barras – Volume II - Planejamento**. 2016. 78 p. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/plano-de-manejo/dcom_plano_de_manejo_Flona_Tres_Barras_vol_II.pdf. Acesso em: 24 nov. 2020.

ISABEL, N.; HOLLIDAY, J. A.; AITKEN, S. N. Forest genomics: Advancing climate adaptation, forest health, productivity, and conservation. **Evolutionary Applications**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 3-10, 2019.

LACERDA, A. E. B. de; ROBERTA NIMMO, E.; SEBBENN, A.M. Modeling the long-term impacts of logging on genetic diversity and demography of *Hymenaea courbaril*. **Forest Science**, [s.l.] v. 59, n. 1, p. 15-26, 2013.

LIEBSCH, D.; MIKICH, S. B. Fenologia reprodutiva de espécies vegetais da Floresta Ombrófila Mista do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 375-391, 2009.

LINDGREN, D.; LUIGI, D. G.; JEFFERSON, P. A. Status number for measuring genetic diversity. **Forest Genetics**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 69-76, 1997.

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**, St. Louis, v. 82, n. 11, p.1420-1425, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2008. 348 p. (v. 1).

LOWE, A. J.; CAVERS, S.; BOSHIER, D.; BREED, M. F.; HOLLINGSWORTH, P. M. The resilience of forest fragmentation genetics—no longer a paradox—we were just looking in the wrong place. **Heredity**, [s.l.], v. 115, p. 97-99, 2015.

MANOEL, R. O.; FREITAS, M. L. M.; FURLANI JÚNIOR, E.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Individual, fruit, and annual variation in correlated mating in a *Genipa americana* population. **Silvae Genetica**, [s.l.], v. 64, n. 3, p. 108-116, 2015.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, [s.l.], v. 403, p. 853-858, 2000.

OLIVEIRA, P. E.; GIBBS, P. E. Reproductive biology of woody plants in a cerrado community of Central Brazil. **Flora**, [s.l.], v. 195, n. 4, p. 311-329, 2000.

OLIVEIRA, S. S.; CAMPOS, T.; SEBBENN, A. M.; D'OLIVEIRA, M. V. N. Using spatial genetic structure of a population of *Swietenia macrophylla* King to integrate genetic diversity into management strategies in Southwestern Amazon. **Forest Ecology and Management**, [s.l.], v. 464, 118040, 2020.

PEREIRA, F. B.; SEBBENN, A. M.; ROSSINI, B. C.; MELCHERT, G. F.; MARINO, C. L.; RIBOLLA, P. E. M.; ALONSO, D. P.; SILVA, E. J. V.; TAMBARUSSI, E. V. Isolation of 27 polymorphic nuclear microsatellite markers for *Roupala montana* var. *brasiliensis* (Proteaceae). **Annals of Brazilian Academy of Science**, Rio de Janeiro, [2020?]. No prelo.

PERES, E. A.; PINTO-DA-ROCHA, R.; LOHMANN, L. G.; MICHELANGELI, F. A.; MIYAKI, C. Y.; CARNAVAL, A. C. Patterns of species and lineage diversity in the Atlantic Rainforest of Brazil. In: RULL, V.; CARNAVAL, A. (eds.). **Neotropical diversification: Patterns and Processes**. Switzerland: Springer, p. 41-448, 2020.

PRANCE, G.; PLANA, V.; EDWARDS, K. S.; PENNINGTON, R. Proteaceae. **Flora Neotropica**, [s.l.], v. 100, p. 211-218, 2007.

- PUPIN, S.; SEBBENN, A. M.; CAMBUIM, J.; SILVA, A. M.; ZARUMA, D. U. G.; SILVA, P. H. M.; ROSSE, L. N.; SOUZA, I. C.; MARINO, C. L.; MORAES, M. L. T. Effects of pollen contamination and non-random mating on inbreeding and outbreeding depression in a seedling seed orchard of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Forest Ecology and Management**, [s.l.], v. 437, p. 272-281, 2019.
- PÜTTKER, T.; CROUZEILLES, R.; ALMEIDA-GOMES, M. et al. Indirect effects of habitat loss via habitat fragmentation: A cross-taxa analysis of forest-dependent species. **Biological Conservation**, [s.l.], v. 241, 108368, 2020.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, [s.l.], v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, [s.l.], v. 43, p. 848-859, 1989.
- RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, [s.l.], v. 88, p. 221-228, 2002.
- SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: SILVA, L. D.; HIGA, A. R. (eds.). **Pomar de espécies florestais nativas**. FUEPEF: Curitiba, 2006. p. 93-138.
- 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**, [s.l.], v. 106, p. 134-145, 2011.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 2. ed. New York: W. H. Freeman, 1981.
- TAMBARUSSI, E.V.; BROSHIER, D.; VENCOVSKY, R.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. Paternity analysis reveals significant isolation and near neighbor pollen dispersal in small *Cariniana legalis* Mart. Kuntze populations in the Brazilian Atlantic Forest. **Ecology and Evolution**, [s.l.], v. 5, n. 23, p. 5588-5600, 2015.
- TAMBARUSSI, E. V.; BOSHIER, D.; VENCOVSKY, R.; FREITAS, M. L. M.; DI-DIO, O. J.; SEBBENN, A. M. Several small: how inbreeding affects conservation of *Cariniana legalis* Mart. Kuntze (Lecythidaceae) the Brazilian Atlantic Forest's largest tree. **International Forestry Review**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 502-510, 2016.
- TAMBARUSSI, E. V.; BOSHIER, D.; VENCOVSKY, R.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Inbreeding depression from selfing and mating between relatives in the Neotropical tree *Cariniana legalis* Mart. Kuntze. **Conservation Genetics**, [s.l.], v. 18, p. 225-234, 2017.
- TEIXEIRA, A. M. G.; SOARES-FILHO, B. S.; FREITAS, S. T.; METZGER, J. P. Modeling landscape dynamics in an Atlantic Rainforest region: Implications for

conservation. **Forest Ecology and Management**, [s.l.], v. 257, n. 4, p. 1219-1230, 2009.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analysis in plant populations. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 921-935, 2004.

VINSON, C.; MANGARAVITE, E.; SEBBENN, A. M.; LANDER, T. Using molecular markers to investigate genetic diversity, mating system and gene flow of Neotropical trees. **Brazilian Journal of Botany**, [s.l.], v. 41, p. 481-496, 2018.

WORLD TIMBERS INC. Wood database and searchable library. **Roupala brasiliensis**. Disponível em:
https://www.woodworkerssource.com/online_show_wood.php?wood=Roupala%20brasiliensis. Acesso em: 26 dez. 2019.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 11, n. 10, p. 413-418, 2001.

CAPÍTULO 5
FLUXO GÊNICO CONTEMPORÂNEO E REALIZADO E OCORRÊNCIA DE
DEPRESSÃO POR ENDOGAMIA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Roupala*
***montana* var. *brasiliensis* (KLOTZSCH) K. S. EDWARDS (PROTEACEAE)**

Resumo

Roupala montana var. *brasiliensis* (Klotzsch) K.S. Edwards é uma espécie madeireira não-endêmica no Brasil, com ocorrência natural em áreas de Mata Atlântica e histórico de exploração comercial. Como se conhece muito pouco da espécie, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da fragmentação no fluxo de pólen e sementes, bem como a ocorrência de depressão por endogamia em mudas obtidas a partir de sementes de polinização aberta. As análises de paternidade (sementes), parentesco (juvenis) e de depressão por endogamia foram baseadas em informações obtidas com nove locos microssatélites em quatro populações de *R. montana* var. *brasiliensis*. As populações, apesar de isoladas espacialmente entre si, não se apresentam isoladas reprodutivamente, recebendo pólen imigrante. Mudas oriundas de autofecundação apresentam menores níveis de depressão por endogamia, o que pode ser efeito de evento de seleção pré-germinação. Não se observou fluxo gênico via sementes. O fluxo de pólen em habitat fragmentado se deu a longas distâncias, o que pode auxiliar na manutenção da diversidade e sobrevivência das populações. Recomenda-se a continuidade da avaliação dos efeitos de depressão por endogamia no ensaio de campo.

Palavras-chave: *Brazilian lacewood*. Carvalho-brasileiro. Floresta Ombrófila Mista. Marcadores microssatélites. Mata Atlântica.

Abstract

Roupala montana var. *brasiliensis* (Klotzsch) K.S. Edwards is a non-endemic Brazilian woody species that occurs in Atlantic Forest areas. With a history of commercial exploitation, little is known about the species. The present study aimed to investigate the effects of fragmentation on the flow of pollen and seeds, as well as the occurrence of inbreeding depression in seedlings obtained from open-pollinated seeds. The analyses of paternity (seedlings), parentage (juveniles), and inbreeding depression were based on information obtained with nine microsatellite loci in four populations of *R. montana* var. *brasiliensis*. The populations, despite being spatially isolated from each other, are not reproductively isolated, receiving immigrant pollen. Seedlings from self-fertilization show lower levels of inbreeding depression, which may be the effect of pre-germination selection events. No gene flow was observed via seeds. The pollen flow in fragmented habitat occurred over long distances, which can help to maintain the diversity and survival of populations. We recommend continuing to evaluate the effects of inbreeding depression in the field trial.

Key-words: Atlantic Forest. Brazilian lacewood. Brazilian oak. Microsatellite markers. Mixed Ombrophilous Forest.

5.1 INTRODUÇÃO

É bem sabido que a fragmentação florestal tem efeitos negativos na manutenção da biodiversidade a longo prazo (HADDAD et al., 2015; PUTTKER et al., 2020). Os efeitos imediatos para populações de plantas são a desconexão entre estas e/ou entre indivíduos dentro destas (YOUNG et al., 2001; LACERDA et al., 2013; CHYBICKI; OLEKSA, 2018), levando a mudanças nos padrões de diversidade genética, estrutura genética espacial, fluxo gênico, endogamia, entre outros (EPPERSON, 2003; FRANKHAN, 2012; LACERDA et al., 2013; FORTI et al., 2014), limitando assim sua viabilidade, persistência e adaptabilidade (YOUNG et al., 1996).

A dispersão de pólen e sementes impacta diretamente na dinâmica de distribuição das espécies, bem como na manutenção do potencial adaptativo, através do fluxo gênico, uma vez que pólen e sementes migrantes podem mitigar os efeitos da endogamia, aumentando a heterozigosidade nos descendentes (CHYBICKI; OLEKSA, 2018). Uma vez que a dispersão de pólen e a dispersão de sementes geralmente apresentam síndromes e/ou vetores diferentes e, portanto, provavelmente respondem de maneiras diferentes à perda e fragmentação de habitat (BROWNE; KARUBIAN, 2018), compreender o processo de dispersão de pólen e sementes é crucial para determinar a capacidade da espécie de interesse em se perpetuar numa paisagem deteriorada (CHYBICKI; OLEKSA, 2018). A sinergia entre os processos de dispersão de pólen e de sementes é um dos fatores que determinam a variabilidade genética das populações (PAREJO-FARNÉS et al., 2017), sendo ainda necessário levar em conta que a dispersão de sementes só contribui para a conectividade genética entre fragmentos e/ou populações após a germinação e estabelecimento das mudas e, portanto, deve ser avaliada na fase de mudas (ISMAIL et al., 2017).

O efeito esperado de restrição do fluxo gênico e, conseqüentemente, o isolamento reprodutivo das populações de espécies arbóreas em função da fragmentação da paisagem, levando ao aumento da endogamia tanto por um incremento no número de cruzamentos entre indivíduos aparentados quanto por ocorrência de autofecundações, pode resultar em depressão por endogamia na população descendente (sementes e regenerantes) (TAMBARUSSI et al., 2017; AGUIAR et al., 2020; PEREIRA L. et al., 2020). A depressão por endogamia tem como a mais evidente das conseqüências observáveis a redução da média fenotípica de

características, especialmente àquelas ligadas à capacidade reprodutiva e/ou eficiência fisiológica (FALCONER; MACKAY, 1996).

A Mata Atlântica como *hotspot* é considerada um dos biomas tropicais mais ameaçados do mundo, restando cerca de 13,1% de sua área com cobertura original e/ou similar (TEIXEIRA et al., 2009; FUNDAÇÃO...; INPE, 2019; PUTTKER et al., 2020), dos quais 80% estão distribuídas em pequenos fragmentos (<50 ha) (RIBEIRO et al., 2009) intercalados com povoaamentos urbanos e atividades econômicas, como agricultura e pecuária. Apesar de ser uma espécie Neotropical com histórico de exploração comercial até sua exaustão, para substituir o *lacewood* australiano (*Cardwellia sublimis*), quando este, por sua vez, se tornou escasso na Austrália (WORLD TIMBERS INC., 2019), *Roupala montana* var. *brasiliensis* (Klotzsch) K.S. Edwards é pouco conhecida. Ocorre em áreas brasileiras de Cerrado e Mata Atlântica, do Sul da Bahia ao Estado do Rio Grande do Sul (LORENZI, 2008). Apresenta inflorescências com flores hermafroditas que são polinizadas por pequenos insetos e abelhas, enquanto suas sementes são dispersas pela gravidade e pelo vento (CARVALHO, 2009; LIEBSCH; MIKICH, 2009; CAMPOS FILHO; SARTORELLI, 2015).

Como discutido no capítulo 3 deste trabalho, apesar das referências da literatura mais antigas afirmarem que a espécie é muito comum (LORENZI, 2008), os poucos registros quantitativos em áreas naturais indicam que a espécie apresenta baixa densidade (<1 árvore ha⁻¹) no Sul do Brasil (CUBAS, 2011; Capítulo 3 deste trabalho). Sua madeira de alta qualidade, comparada ao carvalho-europeu, de onde deriva seu nome comum local – carvalho-brasileiro, pode ser usada para fins nobres como movelaria, construção civil e naval, entre outros (PRANCE et al., 2007).

A partir do exposto, esta pesquisa teve como objetivo investigar os padrões de dispersão de sementes e pólen e a ocorrência de depressão por endogamia em populações pequenas e isoladas de *R. montana* var. *brasiliensis*, em ambiente fragmentado da Mata Atlântica do Sul do Brasil.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Áreas experimentais

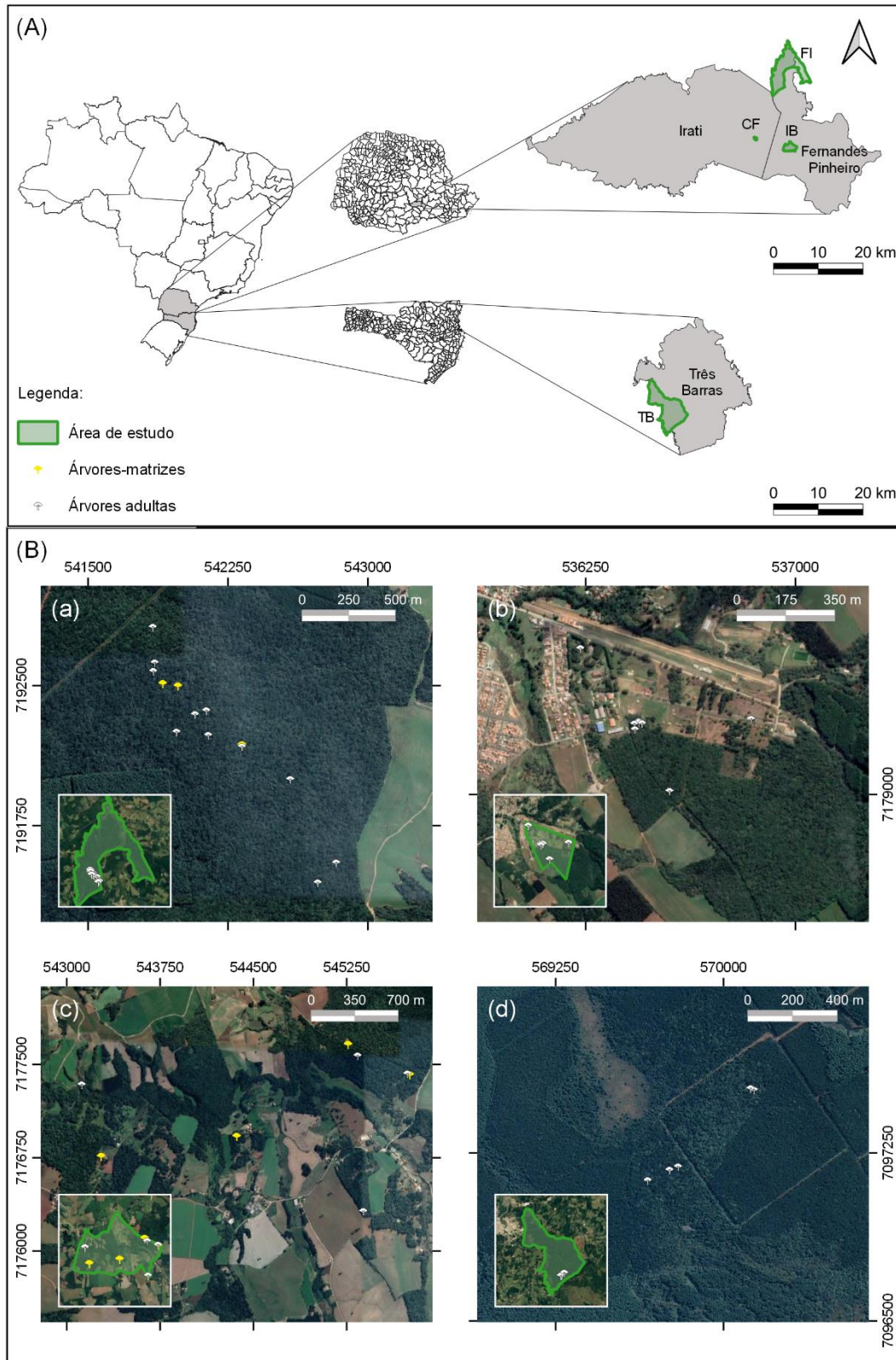
Quatro populações de *R. montana* var. *brasiliensis*, localizadas na Região Sul do Brasil, nos Estados do Paraná e de Santa Catarina (Tabela 1) foram utilizadas para a realização deste estudo. Todas as populações estão inseridas em área cujo Ecossistema é a Floresta Ombrófila Mista (Figura 1) e sob a classificação climática tipo Cfb de Koppen (mesotérmica, subtropical úmida, sem estação seca) (APARECIDO et al., 2016). Um único evento reprodutivo foi observado em 2018 e apenas nas populações FI e IB, ambas localizadas no município de Fernandes Pinheiro/PR, após dois anos de monitoramento da fenologia reprodutiva (2017 e 2018). Os frutos foram coletados diretamente do dossel de três árvores-matrizes em FI e em quatro árvores-matrizes na população IB. As sementes germinadas variaram de 6 a 52 por árvore-matriz, totalizando 161 mudas, das quais se mensuraram o diâmetro do colo (RCD), a altura e sobrevivência aos seis meses de idade. Das mudas (161), indivíduos adultos (35) e de todos os juvenis (305) encontrados nas quatro áreas foram coletadas folhas para as análises de DNA.

Tabela 1 – Caracterização das populações de *Roupala montana* var. *brasiliensis* localizadas em área de Floresta Ombrófila Mista, na região Sul do Brasil

População	N	n_r	n_{st}	n_s	Área (ha)	Densidade (ind ha ⁻¹)	HD	Latitude	Longitude	Localização
FI	14	12	3	35	25	0.56	S/D	25°23'14" S	50°34'45" W	Fernandes Pinheiro, PR
TB	5	15	0	0	26	0.19	S/D	26°12'30" S	50°17'30" W	Três Barras, SC
CF	8	93	0	0	32	0.25	S/D	25°30'20" S	50°38'00" W	Irati, PR
IB	8	185	4	126	400	0.02	Alterada	25°31'20" S	50°33'30" W	Fernandes Pinheiro, PR
Total	35	305	7	161	-	-	-	-	-	-

N : número de indivíduos adultos amostrados; n_r : número total de regenerantes (juvenis) amostrados; n_{st} : árvores-matrizes amostradas em 2018; n_s : número total de mudas obtidas; FI: Floresta Nacional de Irati; TB: Floresta Nacional de Três Barras; CF: Centro Estadual Florestal de Educação Profissional (Cefep) Presidente Costa e Silva; IB: Imbituvão; HD: histórico de distúrbios; S/D: áreas consideradas como em condições similares às originais.

Figura 1 – Mapa de localização das populações de *Roupala montana* var. *brasilensis* em áreas de Floresta Ombrófila Mista na Região Sul do Brasil (A), e distribuição dos indivíduos adultos nas populações (B) Flona-Irati (FI) (a), bosque do Colégio Florestal (CF) (b), conjunto de fragmentos florestais na comunidade do Imbituvão (IB) (c) e Flona-Três Barras (TB) (d)



5.2.2 Extração de DNA e análise de microssatélites

O DNA genômico total foi extraído de folhas de árvores adultas, juvenis e mudas, utilizando o protocolo baseado em Doyle e Doyle (1990) proposto por Faleiro et al. (2003), com modificações. Nove pares de primers polimórficos desenvolvidos por Pereira et al. (2020, no prelo) (aqui reproduzido no capítulo 1) foram usados neste estudo (Rmb7, Rmb10, Rmb11, Rmb13, Rmb14, Rmb20, Rmb23, Rmb29 e Rmb40). Os locos microssatélites foram amplificados por PCR seguindo o programa de amplificação descrito por Pereira et al. (2020, no prelo), em um Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O produto de cada reação de amplificação (1 μ L) foi separado em um analisador de DNA ABI 3500 (Applied Biosystems) e o software GeneMapper v5 (Applied Biosystems) foi usado para analisar os dados genotípicos.

5.2.3 Testes de paternidade

O fluxo contemporâneo de pólen foi investigado usando a análise de paternidade categórica implementada no software Cervus 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007). Considerando a polinização por abelhas e pequenos insetos e as distâncias acima de 8 km entre as áreas de estudo, a análise de paternidade foi realizada para cada população separadamente, usando os genótipos de todas as árvores adultas, árvores-matrizes e mudas (Tabela 1). Todas as árvores adultas em cada população foram usadas como candidatas a doador de pólen. A estatística Δ (MARSHALL et al., 1998) foi usada para atribuição do candidato mais provável a pai, com base nas frequências alélicas de referência de todos os indivíduos genotipados, e cuja significância foi determinada a partir da simulação dos testes de paternidade realizado pelo software Cervus. O Δ crítico foi determinado com base em um nível de confiança de 95%, usando 10.000 repetições, uma razão de erros de genotipagem de 0,01, 70% como a proporção de doadores de pólen amostrados dentro de cada população e um número mínimo de locos necessários fixado em seis. Quando a análise não foi capaz de designar um doador potencial de pólen de dentro da população, a muda foi considerada como tendo recebido um pólen migrante; também se considerou a possibilidade de autopolinização.

Com base nas coordenadas georreferenciadas de todas as árvores, calculou-se a distância de dispersão de pólen mínima, máxima, média e mediana,

considerando a distância Euclidiana entre dois pontos ($D_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2}$), em que (x_i, y_i) são as coordenadas da árvore-matriz i e (x_j, y_j) são as coordenadas do doador de pólen atribuído j). A distribuição da frequência de dispersão de pólen foi comparada com a distribuição da frequência de distâncias entre todas as árvores usando o teste de Kolmogorov-Smirnov (SOKAL; ROHLF, 1981), a fim de investigar a existência de um padrão de isolamento por distância entre árvores dentro de cada população, de modo a verificar se o sucesso reprodutivo está associado à distância entre árvores reprodutivas.

A área efetiva de polinização (A_{ep}) foi calculada pressupondo-a como uma área circular em torno de uma determinada árvore-matriz, $A_{ep} = 2\pi\sigma_p^2$ (LEVIN, 1988), em que σ_p^2 é a variância axial de dispersão de pólen. Também se estimou o raio de polinização como $r_{ep} = \sqrt{A_{ep}/\pi}$ (AUSTERLITZ; SMOUSE, 2001). O fluxo gênico crítico ($C_{GF} = 1 - P_{ex}^n$) foi calculado a partir do poder combinado de exclusão para o segundo par (P_{ex}) e do número de possíveis doadores de pólen na população amostrada (n) (DOW; ASHLEY, 1996). Também estimamos o número de doadores de pólen (N_{ep}) e a correlação de paternidade dentro das progênes ($r_p = 1/N_{ep}$) (RITLAND, 1989).

5.2.4 Sistema de reprodução e depressão por endogamia

Aos níveis de família e população, as taxas de autofecundação (s), cruzamento (t), cruzamento entre indivíduos não aparentados (t_u) e cruzamento entre parentes (t_r) foram estimadas com base no índice de fixação individual (F_i) obtido com o software Spagedi 1.3 (HARDY; VEKEMANS; 2002). As mudas foram agrupadas de acordo com os valores de F_i ; primeiro, em dois grupos: $F_i > 0.3$, para aqueles indivíduos que assumimos como originados de autofecundação (s), e $F_i \leq 0.3$, que assumimos como originários de cruzamento (t); em seguida, o grupo t foi separado novamente em dois outros grupos, $F_i < 0.1$, para cruzamentos entre árvores não relacionadas (t_u), e $0.1 \leq F_i \leq 0.3$, para acasalamento entre parentes (t_r). A taxa de autofecundação ($s = n_s/n$) foi estimada como a proporção de mudas identificadas como originadas de autopolinização (n_s) em relação ao número total de mudas amostradas (n). A taxa de imigração de pólen ($m = n_i/n$) foi estimada pela proporção de mudas

para as quais o candidato a doador de pólen não foi atribuído dentro do conjunto de árvores adultas (n_i) em relação ao total de mudas amostradas (n) (BURCZYK et al., 2004).

A depressão por endogamia (ID) para as mudas aos seis meses de idade foi estimada em termos de acasalamento entre parentes ($ID_r = 100[1 - (\bar{x}_r/\bar{x}_u)]$), autofecundação ($ID_s = 100[1 - (\bar{x}_s/\bar{x}_u)]$) e total para acasalamento entre parentes e autofecundação ($ID_{r+s} = 100[1 - (\bar{x}_{s+r}/\bar{x}_u)]$), com base nas médias das características dos indivíduos classificados em cada classe e a média dos indivíduos originados de cruzamentos não aparentados (\bar{x}_u), conforme determinado pela análise de paternidade e coancestria entre os pais.

5.2.5 Análise de parentesco

O fluxo gênico realizado por pólen e sementes também foi investigado utilizando análise categórica de paternidade implementada no software Cervus 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007), usando os genótipos de todas as árvores adultas e juvenis (Tabela 1). Tal qual o teste de paternidade, a análise foi realizada para cada população separadamente e todas as árvores adultas dentro de cada população foram usadas como candidatos putativos a doador de pólen. A estatística Δ (MARSHALL et al., 1998) foi usada para atribuir o par mais provável de pais, com base nas frequências alélicas de referência de todos os indivíduos genotipados, e cuja significância foi determinada a partir da simulação de paternidade realizada pelo software Cervus. O Δ crítico foi determinado com base em um nível de confiança de 95%, usando 10.000 repetições, uma razão de erros de genotipagem de 0,01, 70% como a proporção de doadores de pólen amostrados dentro de cada população e um número mínimo de locos necessários fixado em cinco. Quando a análise não foi capaz de designar um dos potenciais pais dentro da população, o indivíduo juvenil foi considerado como tendo recebido pólen migrante; se a análise não encontrou o par de pais, o juvenil foi assumido como uma semente migrante. Também consideramos a possibilidade de autopolinização para estimar a autofecundação realizada.

Considerando a polinização (pequenos insetos/abelhas) e a síndrome da dispersão de sementes (gravidade, vento) da espécie, se um único parental foi identificado, presumiu-se ser a árvore-matriz. A partir das coordenadas de todos os

indivíduos juvenis, se ambos os pais foram identificados dentro da população, a árvore mais próxima foi considerada como mãe (BACLES et al., 2006). O fluxo gênico crítico ($C_{GF} = 1 - P_{ex}^n$) (DOW; ASHLEY, 1996) foi calculado a partir do poder combinado de exclusão para o primeiro parental (P_{ex}), obtido com o software Cervus 3.0, e do número de doadores de pólen putativos na população amostrada (n).

A taxa de imigração de sementes e pólen (m) foi estimada como a proporção de mudas que não tinham nenhum dos pais (imigração de semente) ou tinham apenas um pai (imigração de pólen) dentro da população, em relação ao número total de juvenis amostrados (BURCZYK et al., 1996). Estimamos a distância efetiva de dispersão de sementes com base na posição espacial dos juvenis em relação às suas mães putativas; a distância de dispersão do pólen foi baseada na posição entre os dois parentais. O coeficiente de coancestria entre mudas e supostos progenitores foi estimado para confirmar as atribuições de parentesco, usando as estimativas geradas com o software Spagedi 1.3 (HARDY; VEKEMANS, 2002) para o estimador J Nason descrito em Loiselle et al. (1995), com base nas frequências alélicas de referência calculadas na população adulta. A área de polinização efetiva (A_{ep}) e o raio de polinização efetiva (r_{ep}) foram estimados para a dispersão realizada de pólen e sementes utilizando a mesma metodologia da análise de paternidade.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Sistema de reprodução baseado no teste de paternidade e depressão por endogamia

Para a população FI, das 35 mudas germinadas, seis (17,1%) foram classificadas como de autofecundação por apresentarem índice de fixação individual (F_i) $> 0,3$ (s : F_i médio = 0,430) (Tabela 2), sendo os 82,9% restantes provenientes de cruzamento entre indivíduos não aparentados (t_u : F_i médio = -0,094). Para a população IB, das 126 mudas germinadas, 27 (21,4%) foram identificadas como originadas de autopolinização (s : F_i médio = 0,505); a taxa de cruzamento foi de 78,6% ($t_u + t_r$). Treze (10,3%) mudas apresentaram $0,1 \leq F_i \leq 0,3$ (t_r : F_i médio = 0,196), portanto, foram identificadas como provenientes de cruzamento entre árvores

aparentadas, o que significa que as 86 (68,3%) mudas germinadas restantes são resultado de acasalamento entre indivíduos não aparentados (t_u : F_i médio = - 0,002). A porcentagem de todas as mudas endogâmicas ($s+t_r$) foi de 31,7% (F_i médio ponderado = 0,405).

Tabela 2 – Sistema reprodutivo, índice de fixação individual médio (F_i), média das características avaliadas e depressão por endogamia (ID) em mudas de *Roupala montana* var. *brasiliensis*

Grupos ¹	FI: $n = 35$			IB: $n = 126$			
	t_u	s	t_r	t_u	s	t_r	$s+t_r$
Número de mudas (n)	29	6	0	86	27	13	40
Proporção (%)	82,9	17,1	-	68,3	21,4	10,3	31,7
Índice de fixação médio (F_i)	-0,094	0,430	-	-0,002	0,505	0,196	0,405
RCD médio (mm)	1,9	0,6	-	2,0	1,8	1,7	1,8
Altura média (mm)	89,6	32,1	-	86,8	86,6	79,2	84,2
Média de sobrevivência (%)	86	50	-	88	81	54	29
ID para RCD (%)	-	68,2	-	-	8,7	16,3	11,2
ID para altura (%)	-	64,1	-	-	0,3	8,7	3,0
ID para sobrevivência (%)	-	42,0	-	-	7,8	39,1	18,0

FI: Flona-Irati; IB: Imbituvão; t_u é a taxa de cruzamento entre indivíduos não aparentados ($F_i < 0.1$); s é a taxa de autofecundação ($F_i > 0.3$); t_r é a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ($0.1 \leq F_i \leq 0.3$).

Em geral, as mudas resultantes da autofecundação (s) apresentaram médias de diâmetro de colo (RCD), altura e sobrevivência menores do que as de t_u , para ambas as populações (Tabela 2). No entanto, as mudas originadas por cruzamentos aparentados, observadas para a população de IB, apresentaram médias inferiores às originadas de autofecundação, indicando maior depressão por endogamia para este grupo (IB: $ID_r = 8,7-39,1\%$) do que para o grupo autofecundação (IB: $ID_s = 0,3-8,7\%$). A ID total (ID_{s+r}) foi de 3,0%, 11,2% e 18,0% para altura, RCD e sobrevivência, respectivamente. Mudas originadas por autofecundação na população FI foram, em

termos de altura e diâmetro de colo, menores do que aquelas originadas por autofecundação na população IB, resultando em maior ID para a população FI do que para a população IB.

5.3.2 Fluxo gênico contemporâneo e dispersão de pólen

Das populações FI ($n = 35$) e IB ($n = 126$), os prováveis doadores de pólen foram atribuídos a 60% (21 mudas) e 64% (81 mudas), respectivamente (Tabela 3). Isso sugere uma taxa de imigração de pólen de 40% para FI (variação entre árvores-matrizes: 0–52%) e 36% para IB (variação entre árvores-matrizes: 27–42%). A probabilidade combinada de não exclusão do segundo progenitor foi baixa para as populações FI (0,000007) e IB (0,000093), indicando que o fluxo gênico crítico efetivo (FI: $C_{GF} < 0,001$; IB: $C_{GF} < 0,001$) não está tendenciando as estimativas de fluxo de pólen. Na população FI, a taxa de autofecundação (s) variou de 0 a 4% entre as árvores-matrizes, enquanto na população IB, a variação foi entre 9 e 25%. Não foi identificada a ocorrência de cruzamento entre parentes (t_r) com base nas mudas de FI; na população IB, observamos t_r apenas para árvores-matrizes M1 (54%) e M25 (17%). O número médio de doadores de pólen efetivos (N_{ep}) por árvore-matriz foi maior na população IB (4,57) do que na população FI (2,92), resultando em correlações de paternidade (r_p) de 0,22 e 0,34, respectivamente, apesar do maior número de possíveis doadores de pólen (árvores adultas) identificados na população FI (FI: 14; IB: 8).

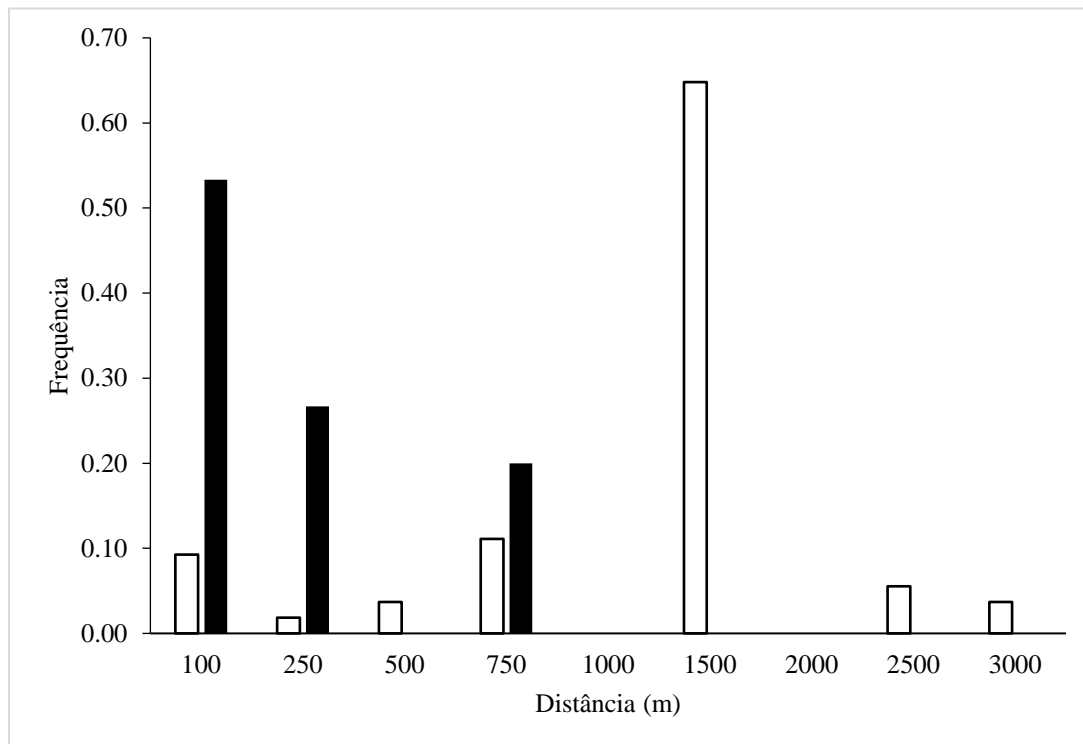
Para as sementes cujo doador de pólen foi identificado dentro do mesmo fragmento, excluindo as de autofecundação, a distância de dispersão do pólen atingiu 203 ± 92 m em FI e 1.160 ± 161 m em IB (Tabela 3). No entanto, a mediana foi menor que a média da distância de dispersão de pólen para a população FI (mediana = 83 m), indicando um padrão de isolamento por distância nesta população. A área de polinização efetiva média (A_{ep}) foi estimada em 19 ha para a população FI (variação entre as árvores-matrizes: 1-15 ha), e em 224 ha na população IB (variação entre as árvores-matrizes: 12,7-404 ha), com um raio efetivo de polinização médio (r_{ep}) de 247 m (variação entre as árvores-matrizes: 45–536 m) e 844 m (variação entre as árvores-matrizes: 201–1,134 m), respectivamente.

Tabela 3 – Análise de fluxo gênico contemporâneo (pólen) em mudas de *Roupala montana* var. *brasiliensis*

	FI				IB				
	M2	M4	M8	Total	M1	M25	M68	M69	Total
Número de sementes (n)	7	7	21	35	22	6	46	52	126
Pólen imigrante (m) (% relativo)	0 (0)	3 (43)	11 (52)	14 (40)	6 (27)	2 (33)	15 (33)	22 (42)	45 (36)
Identificado dentro de população (% relativo)	7 (100)	4 (57)	10 (48)	21 (60)	16 (73)	4 (67)	31 (67)	30 (58)	81 (64)
Autofecundação (s) (% relativo)	0 (0)	2 (29)	4 (19)	6 (17)	2 (9)	1 (17)	11 (24)	13 (25)	27 (21)
Cruzamentos aparentados (t_r) (% relativo)	0	0	0	0	9 (54)	1 (17)	0	0	0.103
Número de doadores de pólen efetivos (N_{ep})	1,32	1	3,6	2,92	1,58	3	3,08	5,07	4,57
Correlação de paternidade (r_p)	0,75	1	0,28	0,34	0,63	0,33	0,32	0,20	0,22
Distância média \pm 1,96SE (m)	97 \pm 26	536 \pm 0	217 \pm 138	203 \pm 92	1.261 \pm 239	1.642 \pm 1.025	1.323 \pm 64	802 \pm 393	1.160 \pm 161
Distância mediana (m)	83	536	179	83	1.347	2.151	1.388	553	1.347
Distância mínima/máxima (m)	83/177	536/536	83/536	83/536	117/2.166	597/2.179	1.161/1.461	22/2.565	22/2.565
Área efetiva de polinização: A_{ep} (ha)	1	NE	15	19	122	343	12,7	404	224
Raio efetivo de polinização: r_{ep} (m)	45	536	222	247	622	1.045	201	1.134	844

FI: Flona-Irati; IB: Imbituvão; M2, M4 e M8: árvores-matrizes de FI; M1, M25, M68 e M69: árvores-matrizes de IB; SE é o erro padrão da média

Figura 2 – Distribuição das frequências de distâncias de dispersão de pólen efetiva para populações de *Roupala montana* var. *brasiliensis*: Flona-Irati (FI - barras pretas) e Imbituvão (IB - barras brancas)



Comparando a frequência de dispersão de pólen efetiva e distância entre todas as árvores reprodutivas usando o teste de Kolmogorov-Smirnov, observamos diferenças significativas apenas para FI (FI: $D = 0,558$, $P < 0,001$; IB: $D = 0,265$, $P = 0,15$), sugerindo uma distribuição não aleatória da distância de polinização no fragmento FI (Figura 2), onde 80% do pólen foi disperso até a classe de 250 m. Para a população IB, 90,7% do pólen estava disperso até 1.500 m (Figura 2). A distância de dispersão de pólen foi maior para a população IB (máximo de 2.565 m) do que para a população FI (máximo de 536 m).

4.3.3 Fluxo gênico realizado e dispersão de sementes e pólen

A probabilidade de não exclusão combinada para o primeiro progenitor foi baixa para todas as populações (FI = 0,000414; TB = 0,005063; CF = 0,00881; IB = 0,003137), indicação de baixa probabilidade de viés no fluxo gênico crítico realizado (C_{GF}) para todas as populações (FI = 0,006; TB = 0,025; CF = 0,068; IB = 0,025). Além disso, a probabilidade combinada de não exclusão para identidade também foi baixa

para todas as populações (FI = 3,384E-14; TB = 2,560E-11; CF = 1,383E-10; IB = 6,928E-12), indicando que todos indivíduos adultos têm um genótipo único. Estes resultados indicam que os níveis observados de pólen crítico e fluxo de sementes não enviesaram nossas estimativas de fluxo gênico de sementes e pólen.

Um único indivíduo juvenil da população CF não teve sua árvore-mãe atribuída (Tabela 4), ao nível de confiança de 95%. Os juvenis identificados como originados de autopolinização (s) representaram 17%, 20%, 4% e 5%, para as populações FI, TB, CF e IB, respectivamente. Doadores de pólen identificados dentro das populações adultas das áreas FI, TB, CF e IB amostradas foram atribuídos a 8 (67%), 12 (80%), 66 (71%) e 142 (77%) do total de juvenis, respectivamente. Os demais juvenis cujos doadores de pólen não foram atribuídos de dentro das áreas de estudo, representam a taxa de imigração de pólen.

O coeficiente médio de coancestria pareada (\pm SE) variou de $0,167 \pm 0,019$ (CF) a $0,253 \pm 0,102$ (FI), entre juvenis e doadores de pólen designados, e entre $0,155 \pm 0,019$ (CF) a $0,203 \pm 0,013$ (IB), para juvenis e respectivas árvores-matrizes atribuídas pela análise; todos esses valores de coancestria foram significativamente diferentes de zero (95% de confiança) (Tabela 4).

Os juvenis foram designados como sementes de seis (43%), quatro (80%), sete (88%) e sete (88%) (árvores-matrizes) do total de 14, cinco, oito e oito árvores adultas das populações FI, TB, CF, e IB amostradas. Para a população CF, um único indivíduo amostrado não foi identificado como árvore-matriz ou doador de pólen; os demais sete indivíduos foram identificados como ambos. Para a população IB, todas as oito árvores adultas amostradas contribuíram com pólen em eventos reprodutivos anteriores. Nas populações FI e TB, seis (43%) e três (60%) dos adultos foram designados como doadores de pólen em eventos reprodutivos passados.

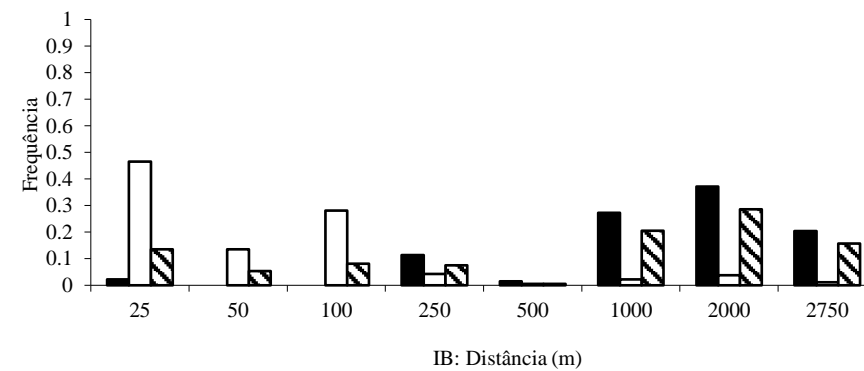
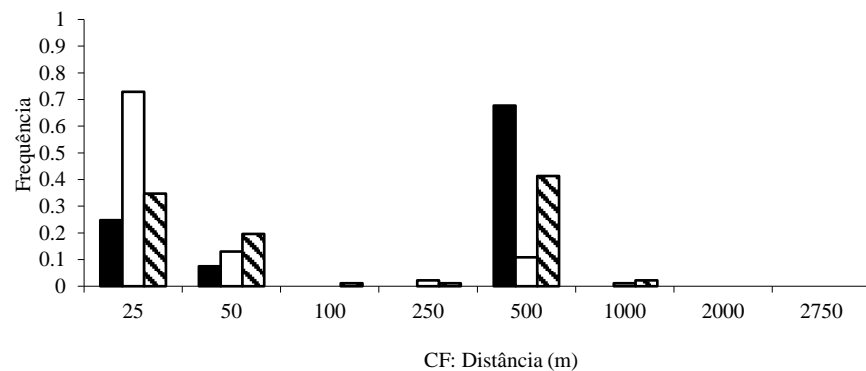
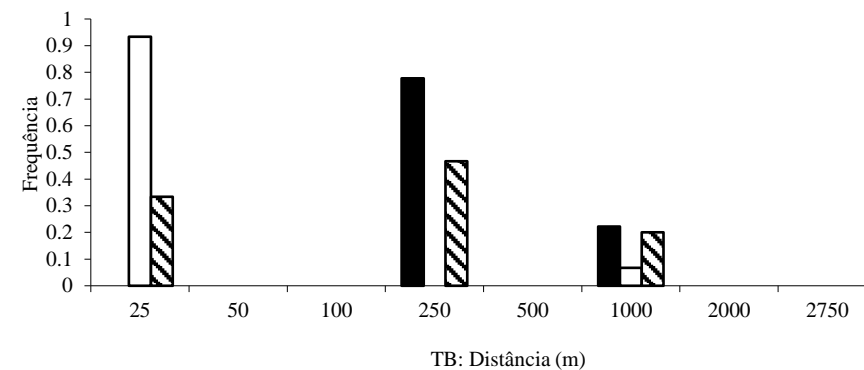
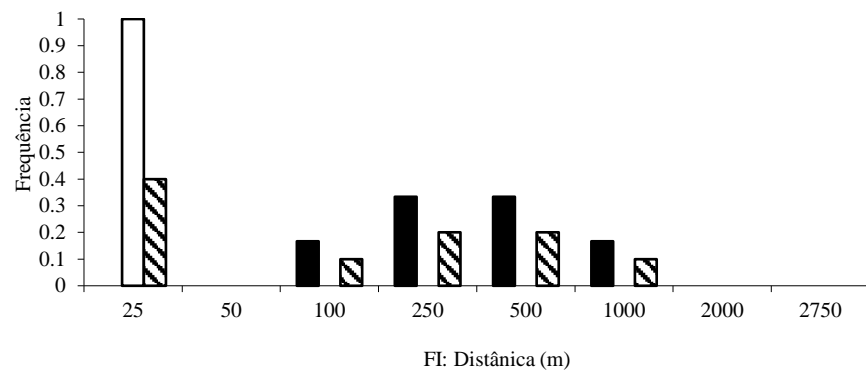
A distância de dispersão do pólen variou de três (distância mínima em CF) a 2.639 m (distância máxima em IB), com uma média que variou de 185 ± 42 m (CF) a 1.168 ± 13 m (IB) (Tabela 4, Figura 3). Para a população FI, aproximadamente 50% do pólen identificado viajou até 250 m e 83% viajou até 500 m (Figura 3); para TB, 78% viajou até 250 m e o total até 1.000 m; para CF, 32% do pólen com doador identificado viajou até 250 m e total até 500 m; para IB, 42% do pólen atribuído viajou até 1.000 m e 80% até 2.000 m.

Tabela 6 – Análise de dispersão realizada de pólen e sementes para populações de *Roupala montana* var. *brasiliensis*

	<i>n</i>	<i>s</i> (%)	Fluxo gênico (%)		Distância de dispersão (m)			A_{rp} (ha)	r_{rp} (m)	Coancestria	
			Dentro	Fora	Média ± SE	Mediana	Min/Máx			Média ± SE	Min/Máx
FI											
Pólen	12	2 (17)	8 (67)	4 (33)	268 ± 135	233	83/573	14.9	218	0,253 ± 0,102	-0,075/0,404
Semente	12	-	12 (100)	0 (0)	10 ± 4	9	1/20	-	-	0,182 ± 0,09	-0,095/0,341
TB											
Pólen	15	3 (20)	12 (80)	3 (20)	212 ± 112	149	108/513	16.6	230	0,193 ± 0,064	0,071/0,349
Semente	15	-	15 (100)	0 (0)	50 ± 81	7	1/627	-	-	0,199 ± 0,075	-0,119/0,495
CF											
Pólen	93	4 (4)	66 (71)	27 (29)	185 ± 42	253	3/416	17.7	238	0,167 ± 0,019	0,035/0,501
Semente	93	-	92 (99)	1 (1)	63 ± 27	17	2/809	-	-	0,155 ± 0,019	-0,003/0,501
IB											
Pólen	185	10 (5)	142 (77)	43 (23)	1.168 ± 135	1.253	22/2.639	392.5	1118	0,214 ± 0,016	0,040/0,550
Semente	185	-	185 (1)	0 (0)	119 ± 47	28	1/2.175	-	-	0,203 ± 0,013	0,017/0,550

n é o tamanho da amostra; *s* é a taxa de autofecundação; SE é o erro padrão da média; A_{rp} é a área de polinização realizada; r_{rp} é o raio de polinização realizada. FI: Flona-Irati; TB: Flona-Três Barras; CF: Cólegio Florestal; IB: Imituvão. ^a Os valores de média, mediana e mín/máx são para a distância mínima entre juvenil e pais designados na análise.

Figura 3 – Distribuição das frequências de distância de dispersão de pólen realizadas (barras pretas) e das distâncias mínimas (barras brancas) e máximas (barras hachuradas) de dispersão de sementes para as populações de *Roupala montana* var. *brasiliensis*: Flona-Irati (FI), Flona-Três Barras (TB), Colégio Florestal (CF) e Imbituvão (IB)



Com base nesses resultados, a área média de polinização realizada (A_p) foi estimada em 14,9, 16,6, 17,7 e 392,5 ha para as populações FI, TB, CF e IB, respectivamente. O raio médio de polinização realizada (r_p) foi estimado em 218, 230, 238 e 1.118 m para as populações FI, TB, CF e IB, respectivamente.

As estimativas para distância mínima de dispersão de sementes variaram de um (distância mínima em FI, TB e IB) a 2.175 m (distância máxima em IB) m, com uma média entre 10 ± 4 m (FI) e 119 ± 47 m (IB) (Tabela 4; Figura 3). Para a população FI, todas as sementes foram encontradas dentro de um raio de 25 m da árvore-matriz; (Figura 3); para TB, 93% foram observadas até 25 m de distância; para CF, 73% das sementes se estabeleceram até 25 m e 99% delas foram observadas como juvenis em até 500 m da árvore-matriz; para IB, 47% dos juvenis com árvores-matrizes atribuídas se estabeleceram dentro de um raio de 25 m da árvores-matriz e 88% dele, em até 100 m.

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 Sistema reprodutivo e depressão por endogamia

Os resultados da análise de paternidade (mudas) corroboraram com o observado a partir da análise com o software MLTR (RITLAND, 2002) (Capítulo 4), em que a espécie em estudo resultou como preferencialmente alógama, uma vez que os valores de taxa de cruzamento (t) foram próximos aos 83% anteriormente apresentados (FI: 82,9%; IB: 78,6%). Além disso, a análise de paternidade confirmou a não ocorrência de cruzamentos aparentados na população FI, como previamente identificado. Entretanto, ressalta-se que, neste caso, o pequeno número de matrizes florescidas pode explicar tal resultado, dado que há estruturação genética significativa (Capítulo 4).

O resultado observado anteriormente para endogamia biparental na população IB ($t_r = 0,10$) foi subestimado em 50% pela análise realizada no MLTR ($t_m - t_s = 0,05$). Pereira L. et al. (2020) observou a mesma relação entre as estimativas, explicando que esta diferença está associada aos métodos de estimação utilizados. Enquanto o MLTR utiliza o modelo de sistema misto de reprodução para obter $t_m - t_s$, na metodologia via análise de paternidade empregam-se duas estratégias: primeiro,

define-se se a muda é resultante de cruzamento entre indivíduos aparentados baseado no valor do índice de fixação individual (F_i) e, na sequência, confirma-se este status com base na análise de paternidade (PEREIRA L. et al., 2020).

Autofecundações resultam em ao menos 50% de endogamia, enquanto cruzamentos aparentados resultam numa endogamia igual a coancestria observada para os pais em questão (LINDGREN et al., 1997). A avaliação das características de crescimento em mudas de *R. montana* var. *brasiliensis*, indicam que o grupo de autofecundação (s) apresentam menor ID do que o observado para mudas originadas de cruzamentos aparentados (t_r), ao contrário do esperado e observado para outras espécies florestais (TAMBARUSSI et al., 2017; PEREIRA L. et al., 2020). Uma possível explicação é que a taxa de autofecundação real seja maior do que o observado para sementes germinadas, concentrando os efeitos de depressão por endogamia na produção de sementes inviáveis, ou seja, aquelas que não germinaram em função de mecanismos pós-zigóticos, por exemplo (TAMBARUSSI et al., 2017; AGUIAR et al., 2020; PEREIRA L. et al., 2020). O menor valor de ID para a sobrevivência das mudas em relação às outras características avaliadas e, também em relação à classe t_r , para população IB, podem ser indicativos de que o expurgo de indivíduos de autofecundação se deu antes da efetiva germinação. De fato, uma proporção considerável de sementes ($\approx 70\%$) postas para germinar não emergiram durante a fase inicial do trabalho (comunicação pessoal).

Entre as características de crescimento avaliadas, observou-se maior ID para RCD em relação à altura das mudas para todos os casos. Diferenças entre características são esperadas e também já foram relatadas em outras espécies (AGUIAR et al., 2020). A população FI, por sua vez, apresentou os mais altos valores de ID para todas as características avaliadas. Variações entre populações são esperadas, até mesmo entre indivíduos dentro de populações, dado que ID depende da frequência de alelos deletérios disponíveis no evento reprodutivo considerado (TAMBARUSSI et al., 2017). Este resultado, baseado no número ínfimo de sementes obtidas ($n=35$) para todas as três árvores-matrizes (dentre 14 adultos amostrados), e o baixo volume de regenerantes (12 juvenis) observados em 26 ha mais uma vez corroboram que esta população está isolada reprodutivamente e não está conseguindo obter sucesso na perpetuação via reprodução. Assim, se a espécie de fato apresenta mecanismo de autoincompatibilidade e não há pólen cruzado

disponível, seja pela baixa densidade de indivíduos florescidos ou de polinizadores disponíveis, restando apenas a autofecundação como alternativa, uma possível explicação é que essa baixa produção de sementes pode estar associada ao aborto de flores, frutos e sementes produzidos pelos indivíduos em função da polinização inadequada (AGUIAR et al., 2020).

Assim como para outros estudos ressaltam, a presente avaliação foi conduzida em ambiente controlado (viveiro), sendo importante a continuidade das avaliações de ocorrência de depressão por endogamia em condições de campo/floresta (PEREIRA L., et al., 2020). O teste de progênies utilizado como base para este estudo encontra-se implantado a campo na área experimental anexa ao Campus Irati da Universidade Estadual do Centro-Oeste, o que permitirá tal feito.

5.4.2 Fluxo gênico: sementes

A ausência de migração de sementes (um único evento dentro da população CF) reforça a teoria de que as sementes, por gravidade, acabam caindo a curtas distâncias das árvores-matrizes, tal qual indicado pela distância média de dispersão de sementes (maior média = 119 m). Este resultado também explica a estruturação genética observada no Capítulo 3, dado que a maioria dos juvenis foram encontrados distantes até 25 m da provável árvore-matriz. Assim, apesar de que fluxo gênico baseado em sementes tenha potencial dobrado de incrementar diversidade genética (CHYBICKI; OLEKSA, 2018), para *R. montana* var. *brasiliensis*, o fluxo de pólen parece ser mais significativo neste sentido.

Maiores esforços de pesquisa podem elucidar se os processos de dispersão de sementes para a espécie em estudo foram prejudicados pela perda de habitat e mudança na paisagem original. Também, estratégias de manejo visando garantir a colonização das áreas de ocorrência da espécie podem ser necessários para garantir a manutenção da mesma em seu habitat, como pela dispersão artificial de sementes e enriquecimento via plantio de mudas (ISMAIL et al., 2012; ISMAIL et al., 2017).

5.4.3 Fluxo gênico: pólen

As populações amostradas indicam que não há isolamento reprodutivo, apesar de FI estar efetivamente isolada espacialmente, e CF e IB estarem localizadas em

ambiente altamente antropizado e fragmentado, apresentando altas taxas de imigração de pólen tanto na avaliação do fluxo gênico contemporâneo ($m = 36\text{--}40\%$) quanto realizado ($m = 20\text{--}37\%$). Entretanto, é preciso ter cuidado ao considerar este resultado pontualmente positivo observado para população FI, em vista dos pontos já levantados anteriormente sobre esta população: redução na diversidade, baixo sucesso reprodutivo, baixa regeneração, poucos indivíduos florescendo.

Em compensação, considerando o maior número médio de doadores efetivos de pólen (N_{ep}) (fluxo contemporâneo), se as maiores taxas de imigração de pólen, observadas tanto na análise de paternidade quanto na análise de parentesco, para a população IB se mantiveram consistente ao longo de subseqüentes eventos reprodutivos, o fluxo gênico nesta área pode ser suficiente para manter ou aumentar a diversidade genética, bem como o tamanho efetivo de população (TAMBARUSSI et al., 2015), apesar dos níveis de endogamia significativos observados para as mudas, a estruturação genética significativa (veja o Capítulo 3) e a paisagem constantemente alterada por ação humana.

Para o fluxo de pólen contemporâneo, as distâncias de dispersão de pólen em IB (máximo de 2.565 m, média de 1,160 m) foram maiores do que para FI (máximo de 536 m, média de 203 m). Tal padrão distinto entre as áreas ficam evidentes observando a mediana em relação à média; para a população FI a mediana (83 m) menor que a média (203 m) reforça um isolamento por distância, levando a uma tendência de cruzamentos entre árvores mais próximas, resultado em cruzamentos não aleatórios (teste de Kolmogorov-Smirnov significativo) (TAMBARUSSI et al., 2015), reforçando o já discutido previamente. Para o fluxo de pólen realizado, as distâncias de dispersão mantiveram a mesma média, com valor máximo ligeiramente maior, para população IB (máximo de 2.639 m, média de 1,160 m), sendo também, em linhas gerais, maior que nas demais populações.

Distâncias longas de dispersão de pólen (contemporâneo e realizado) e áreas grandes de polinização efetiva em espécies polinizadas por abelhas já foram relatadas (ROSAS et al., 2011; LEAL et al., 2014; TAMBARUSSI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2020). Em ambientes mais intensamente fragmentados, este aumento no raio de polinização é algo esperado, dado que para conseguir o alimento, o polinizador necessita viajar a maiores distâncias (TAMBARUSSI et al., 2015). Muito embora seja esperado que a fragmentação do habitat impacte negativamente no fluxo gênico

realizado por insetos, em alguns casos, estes parecem ser resistentes, mantendo os serviços (BROWNE; KARUBIAN, 2018). Além disso, as abelhas são polinizadores conhecidos por facilitar o fluxo gênico, inclusive nestas paisagens florestais fragmentadas, atingindo distâncias de até 3,1 km em ambiente fragmentado (DICK et al., 2008; DEGEN; SEBBENN, 2014; TAMBARUSSI et al., 2015), sendo o principal tipo de vetor em florestas tropicais (DICK et al., 2008). Este resultado de fluxo gênico reitera que polinização a longas distâncias por insetos não-específicos é efetiva na manutenção da espécie em paisagens profundamente alteradas, seja por aumento na distância entre fragmentos e/ou entre indivíduos (DICK et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, B. I.; FREITAS, M. L. M.; ZANNATO, A. S.; TAMBARUSSI, E. V.; MORAES, M. T.; AMBROSANO, M. N.; PEREIRA, L. C. S. M.; GANDARA, F. B.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. The effects of pollen dispersal and mating pattern on inbreeding depression and hybrid vigor in *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl. (Rutaceae). **Conservation Genetics**, [s.l.], v. 21, p. 305-317, 2020.
- APARECIDO, L. E. O.; ROLIM, G. S.; RICHETTI, J.; SOUZA, P. S.; JOHANN, J. A. Köppen, Thornthwaite and Camargo climate classifications for climatic zoning in the State of Paraná, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 4, p. 405-417, 2016.
- AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P. E. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between Φ_{ft} , pollen dispersal and interfemale distance. **Genetics**, [s.l.], v. 157, n. 2, p. 851-857, 2001.
- BACLES, C.F.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. Effective seed dispersal across a fragmented landscape. **Science**, [s.l.], v. 311, n. 5761, p. 628-628, 2006.
- BROWNE, L.; KARUBIAN, J. Habitat loss and fragmentation reduce effective gene flow by disrupting seed dispersal in a neotropical palm. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 27, n. 15, p. 3055-3069, 2018.
- BURCZYK, J.; DIFAZIO, S. P.; ADAMS, W. T. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel?. **Forest Genetics**, [s.l.] v. 11, n. 3/4, p. 179-192, 2004.
- CAMPOS FILHO, E. M.; SARTORELLI, P. A. R. **Guia de identificação de espécies-chave para a restauração florestal na região do Alto Teles Pires, Mato Grosso**. São Paulo: The Nature Conservancy, 2015.
- CARVALHO, P. E. R. **Carvalho-do-Cerrado: *Roupala montana***. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2009. 8 p. (Comunicado Técnico, n. 223).
- CHYBICKI, I. J.; OLEKSA, A. Seed and pollen gene dispersal in *Taxus baccata*, a dioecious conifer in the face of strong population fragmentation. **Annals of Botany**, [s.l.], v. 122, n. 3, p. 409-421, 2018.
- CUBAS, R. **Florística, estrutura e dinâmica em uma Floresta Ombrófila Mista no norte do Estado de Santa Catarina**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade do Centro-Oeste do Paraná, Irati, 2011.
- DEGEN, B.; SEBBENN, A. M. Genetics and tropical forest. In: PANCEL, L.; KOHL, M. (eds.) **Tropical Forest Handbook**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. p. 1-30.
- DICK, C. W.; HARDY, O. J.; JONES, F. A.; PETIT, R. J. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. **Tropical Plant Biology**, [s.l.], v. 1, p. 20-33, 2008.
- DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 5, n. 5, p. 615-627, 1996.

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

EPPERSON, B.K. **Geographical genetics**. New Jersey: Princeton University Press, 2003. (Monographs in Population Biology, v. 38).

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Essex: Longmans Green, 1996.

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando análises moleculares**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2003, 5 p. (**Comunicado Técnico**, 92).

FORTI, G.; TAMBARUSSI, E. V.; KAGEYAMA, P. Y.; MORENO, M A.; FERRAS, E. M.; IBÁÑEZ, B.; MORI, G. M.; VENCOVSKY, R.; SEBBENN, A. M. Low genetic diversity and intrapopulation spatial genetic structure of the Atlantic Forest tree, *Esenkia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Annals of Forest Research**, [s.l.], v. 57, n. 2, p. 165-174, 2014.

FRANKHAN, R. How closely does genetic diversity in finite populations conform to predictions of neutral theory? Large deficits in regions of low recombination. **Heredity**, [s.l.], v. 168, p. 167-178, 2012.

HADDAD, N. M.; BRUDVIG, L. A.; CLOBERT, J.; et al. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. **Science Advances**, [s.l.], v. 1, n. 2, e1500052, mar. 2015.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 618-620, 2002.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - INPE. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata atlântica – Período 2017-2018**. 2019. (Relatório Técnico). Disponível em: https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2019/05/Atlas-mata-atlantica_17-18.pdf. Acesso em: 24 abr. 2020.

ISMAIL, S. A.; GHAZOUL, J.; RAVIKANTH, G.; UMA SHAANKER, R.; KUSHALAPPA C. G.; KETTLE, C. J. Does long-distance pollen dispersal preclude inbreeding in tropical trees? Fragmentation genetics of *Dysoxylum malabaricum* in an agro-forest landscape. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 21, n. 22, p. 5484-5496, 2012.

ISMAIL, C.A.; GHAZOUL, J.; RAVIKANTH, G.; KUSHALAPPA, C.G.; SHAANKER, R.U.; KETTLE, C.J. Evaluating realized seed dispersal across fragmented tropical landscapes: a two-fold approach using parentage analysis and the neighbourhood model. **New Phytologist**, [s.l.], v. 214, n. 3, p. 1307-1316, 2017.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular ecology**, [s.l.], v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007.

LACERDA, A. E. B. de; ROBERTA NIMMO, E.; SEBBENN, A. M. Modeling the long-term impacts of logging on genetic diversity and demography of *Hymenaea courbaril*. **Forest Science**, [s.l.] v. 59, n. 1, p. 15-26, 2013.

LEAL, J. B.; SANTOS, R. P.; GAIOTTO, F. A. Effect of selective logging on genetic diversity and gene flow in *Cariniana legalis* sampled from a cacao agroforestry system. **Genetics and Molecular Research**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 626-635, 2014.

LEVIN, D. A. The paternity pool of plants. **The American Naturalist**, [s.l.], v. 132, n. 3, p. 309-317, 1988.

LIEBSCH, D.; MIKICH, S. B. Fenologia reprodutiva de espécies vegetais da Floresta Ombrófila Mista do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 375-391, 2009.

LINDGREN, D.; LUIGI, D. G.; JEFFERSON, P. A. Status number for measuring genetic diversity. **Forest Genetics**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 69-76, 1997.

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**, St. Louis, v. 82, n. 11, p.1420-1425, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2008. (v. 1).

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUIK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 639–655, 1988.

OLIVEIRA, S. S.; CAMPOS, T.; SEBBENN, A. M.; D'OLIVEIRA, M. V. N. Using spatial genetic structure of a population of *Swietenia macrophylla* King to integrate genetic diversity into management strategies in Southwestern Amazon. **Forest Ecology and Management**, [s.l.], v. 464, 118040, 2020.

PAREJO-FARNÉS, C.; ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; ALBALADEJO, R. G.; RUBIO-PÉREZ, E.; APARICIO, A. Effects of habitat fragmentation on parental correlations in the seed rain of a bird-dispersed species. **Tree Genetics & Genomes**, [s.l.], v. 13, 17, 2017.

PEREIRA, F. B.; SEBBENN, A. M.; ROSSINI, B. C.; MELCHERT, G. F.; MARINO, C. L.; RIBOLLA, P. E. M.; ALONSO, D. P.; SILVA, E. J. V.; TAMBARUSSI, E. V. Isolation of 27 polymorphic nuclear microsatellite markers for *Roupala montana* var. *brasiliensis* (Proteaceae). **Annals of Brazilian Academy of Science**, Rio de Janeiro, [2020?]. No prelo.

PEREIRA, L. C. S. M.; TAMBARUSSI, E. V.; BILIATI, M. O.; MARTINS, K.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Inbreeding depression from selfing and mating among relatives of *Hymenaea courbaril* L. **Forest Ecology and Management**, [s.l.], v. 475, 118414, 2020.

PRANCE, G.; PLANA, V.; EDWARDS, K. S.; PENNINGTON, R. Proteaceae. **Flora Neotropica**, [s.l.], v. 100, p. 211-218, 2007.

PÜTTKER, T.; CROUZEILLES, R.; ALMEIDA-GOMES, M. et al. Indirect effects of habitat loss via habitat fragmentation: A cross-taxa analysis of forest-dependent species. **Biological Conservation**, [s.l.], v. 241, 108368, 2020.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, [s.l.], v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, [s.l.], v. 43, p. 848-859, 1989.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, [s.l.], v. 88, p. 221-228, 2002.

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

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 2. ed. New York: W. H. Freeman, 1981.

TAMBARUSSI, E.V.; BROSHIER, D.; VENCOVSKY, R.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. Paternity analysis reveals significant isolation and near neighbor pollen dispersal in small *Cariniana legalis* Mart. Kuntze populations in the Brazilian Atlantic Forest. **Ecology and Evolution**, [s.l.], v. 5, n. 23, p. 5588-5600, 2015.

TAMBARUSSI, E. V.; BOSHIER, D.; VENCOVSKY, R.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Inbreeding depression from selfing and mating between relatives in the Neotropical tree *Cariniana legalis* Mart. Kuntze. **Conservation Genetics**, [s.l.], v. 18, p. 225-234, 2017.

TEIXEIRA, A. M. G.; SOARES-FILHO, B. S.; FREITAS, S. T.; METZGER, J. P. Modeling landscape dynamics in an Atlantic Rainforest region: Implications for conservation. **Forest Ecology and Management**, [s.l.], v. 257, n. 4, p. 1219-1230, 2009.

VINSON, C.; MANGARAVITE, E.; SEBBENN, A. M.; LANDER, T. Using molecular markers to investigate genetic diversity, mating system and gene flow of Neotropical trees. **Brazilian Journal of Botany**, [s.l.], v. 41, p. 481-496, 2018.

WORLD TIMBERS INC. Wood database and searchable library. **Roupala brasiliensis**. Disponível em: https://www.woodworkerssource.com/online_show_wood.php?wood=Roupala%20brasiliensis. Acesso em: 26 dez. 2019.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 11, n. 10, p. 413-418, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa gerou vinte e cinco locos microssatélites polimórficos específicos para *Roupala montana* var. *brasiliensis*, dos quais o conjunto validado (nove), apresentam-se apropriados para os estudos de Genética de Populações conduzidos, bem como são promissores para estudos com outras espécies do mesmo gênero, dada a característica de transferibilidade dos marcadores microssatélites.

A espécie *R. montana* var. *brasiliensis* é uma espécie com reprodução preferencialmente por cruzamentos que ocorre em baixa densidade em áreas de Floresta Ombrófila Mista, no Bioma Mata Atlântica. Há estruturação genética nas populações estudadas. As populações observadas, apesar de pequenas, são diversas entre si e, considerando o contraste de paisagens, a espécie parece apresentar resistência ao efeito da fragmentação no que se refere ao sistema reprodutivo e manutenção do fluxo gênico, como indicado pelas longas distâncias de polinização observadas. Assim, estratégias de conservação *in situ* são recomendadas, associadas a estratégias de enriquecimento.

A ausência de fluxo gênico via imigração de sementes, sugere que a espécie, principalmente em áreas consideradas como representativas do estado natural do ecossistema, necessita da atenção e intervenção humana para reestabelecer fluxo e diversidade genética. Como a espécie tolera algum grau de depressão por endogamia em função de ocorrência de autofecundação e cruzamentos aparentados, recomenda-se que para o enriquecimento das áreas naturais via mudas, realize-se uma seleção das mudas maiores, mais saudáveis e vigorosas.

As análises quantitativas a partir do teste de progênies aos seis meses de idade indicam existência de variabilidade genética nas progênies e populações estudadas, podendo ser um ponto de partida para estabelecimento de um programa de pré-melhoramento da espécie. De modo geral, a avaliação quantitativa do teste de progênies e procedências de *R. montana* var. *brasiliensis* indica que há potencial para início do pré-melhoramento da espécie, dada a existência de variabilidade genética entre os indivíduos e progênies.

Contudo, as análises moleculares indicam que é necessário buscar um número maior de árvores-matrizes para incrementar a base genética e assegurar capacidade de adaptação e ganhos genéticos no médio e longo prazo, viabilizando melhoramento genético, conservação *ex situ* e formação de banco ativo de germoplasma. Neste

interim, a coleta de sementes de 58 árvores-matrizes com distância mínima de 300 m entre si deve ser respeitada visando assegurar diversidade genética e o não-parentesco entre árvores.

REFERÊNCIAS

- BACKES, A. Determinação da idade e regeneração natural de uma população de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em um povoamento florestal localizado no município de Caxias do Sul, RS, Brasil. **Iheringia**, Porto Alegre, v. 5, n. 6, p. 115-130, 2001. (Série Botânica).
- BOEGER, M. R. T.; KAEHLER, M.; MELO JÚNIOR, J. C. F.; GOMES, M. Z.; CHAVES, C. R. M.; SCHOLTTZ, E.S. Estrutura foliar de seis espécies de subosque de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista. **Hoehnea**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 521-531, 2006.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p. (v. 1).
- CAVERS, S.; DEGEN, B.; CARON, H.; LEMES, M.R.; MARGIS, R.; SALGUEIRO, F.; LOWE, A.J. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. **Heredity**, [s.l.], v. 95, p. 281-289, 2005.
- CUBAS, R. **Florística, estrutura e dinâmica em uma Floresta Ombrófila Mista no norte do Estado de Santa Catarina**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade do Centro-Oeste do Paraná, Irati, 2011.
- DEFAVARI, G.R.; TARAZI, R.; MORENO, M.A.; FERRAZ, E.M.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.K. Estrutura genética espacial intrapopulacional de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne na Estação Ecológica de Itirapina, SP. Piracicaba SP. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 89-98, 2009.
- DEGEN, B.; SEBBENN, A. M. Genetics and tropical forest. *In*: PANCEL, L.; KOHL, M. **Tropical Forest Handbook**, Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. p. 1-30.
- DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J.C.B. **Recomposição de Matas Ciliares: orientações básicas**. São Paulo: IF, 1990. (Série Registros, n. 4).
- EPPERSON, B.K. **Geographical genetics**. New Jersey: Princeton University Press. 2003. (Monographs in Population Biology, v. 38).
- FALEIRO, F.G. **Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de uso e conservação dos recursos genéticos**. Platina: Embrapa Cerrados, 2007.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Cenargen, 1998.
- FIGUEIREDO FILHO, A.; DIAS, A. N.; STEPKA, T. F.; SAWCZUK, A. R. Crescimento, mortalidade, ingresso e distribuição diamétrica em floresta ombrófila mista. **Floresta**, Curitiba, v. 40, n. 4, p. 763-776, 2010.
- FRANKHAN, R. How closely does genetic diversity in finite populations conform to predictions of neutral theory? Large deficits in regions of low recombination. **Heredity**, [s.l.], v. 168, p. 167-178, 2012.

GONZALEZ, C.C.; GANDOLFO, M.A.; CÚNEO, R.N. Leaf architecture and epidermal characters of the Argentinean species of Proteaceae. **International Journal of Plant Sciences**, [s.l.], v. 165, n. 4, p. 521-536, 2004.

GRATTAPAGLIA, D. **Status atual de genômica aplicada ao melhoramento florestal e o novo paradigma da seleção genômica ampla**. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SILVICULTURA, 3., 2014, Campinas. **Anais [...]**. Curitiba: Brazil Publishing, 2014.

LACERDA, A. E. B. de; ROBERTA NIMMO, E.; SEBBENN, A. M. Modeling the long-term impacts of logging on genetic diversity and demography of *Hymenaea courbaril*. **Forest Science**, [s.l.] v. 59, n. 1, p. 15-26, 2013.

LONGHI, R. A. **Livro das árvores: árvores e arvoretas do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: L&PM, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2008. (v. 1).

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology And Systematics**, [s.l.], v. 15, p. 65-95, 1984.

MEDEIROS, J.D. Os Estados da Mata Atlântica: Santa Catarina. In: CAMPANILI, M. PROCHNOW, M. (org.). **Mata Atlântica: Uma rede pela floresta**. 1. ed. Brasília: RMA, 2006. p. 45-57. (v. 1).

NAVE, A. G.; RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S. Planejamento e recuperação ambiental da Fazenda São Pedro da Mata Município de Riolândia – SP. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 3., 1997, Ouro Preto. **Anais [...]**. [s.n.], 1997.

PINTO, J. R. R. **Levantamento florístico, estrutura da comunidade arbóreo-arbustiva e suas correlações com as variáveis ambientais em uma floresta de vale no Parque Nacional da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso**. 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

PIRES, P. T. L.; ZENI JUNIOR, D. M.; GAULKE, D. As unidades de conservação e a floresta ombrófila mista no estado do Paraná. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 589-603, 2012.

REGO, G.M. **Monitoramento da fenologia de espécies Arbóreas das florestas brasileiras**. Curitiba: Embrapa Floresta, 2009.

RESENDE, M.D.V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2002.

SEBBENN, A.M.; FREITAS, M.L.M.; ZANATTO, A.C.S.; MORAES, E.; MORAES, M.A. Conservação *ex situ* e pomar de sementes em banco de germoplasma de *Balfourodendron riedelianum*. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 101-112, 2007.

SELKOE, K.A, TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**. [s.l.], v.9, n.5, p.615-629, 2006.

SONEGO, R. C.; BACKES, A.; SOUZA, A. F. Descrição da estrutura de uma Floresta Ombrófila Mista, RS, Brasil, utilizando estimadores não-paramétricos de riqueza e rarefação de amostras. **Acta Botanica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 943-955, 2007.

TAMBARUSSI, E.V.; BROSHIER, D.; VENCOVSKY, R.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. Paternity analysis reveals significant isolation and near neighbor pollen dispersal in small *Cariniana legalis* Mart. Kuntze populations in the Brazilian Atlantic Forest. **Ecology and Evolution**, [s.l.], v. 5, n. 23, p. 5588-5600, 2015.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 11, n. 10, p. 413-418, 2001.