

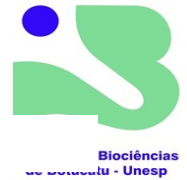
SISTEMA DE REPRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA
VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Astronium fraxinifolium* Schott
EM TESTE DE PROCEDÊNCIAS E PROGÊNIES

MAIARA RIBEIRO CORNACINI

**Botucatu - São Paulo
2021**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

SISTEMA DE REPRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA
VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Astronium fraxinifolium* Schott
EM TESTE DE PROCEDÊNCIAS E PROGÊNIES

MAIARA RIBEIRO CORNACINI

DR. CELSO LUIS MARINO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título Doutora no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas - Genética.

**Botucatu - SP
2021**

C812s	Cornacini, Maiara Ribeiro Sistema de reprodução e distribuição da variabilidade genética de <i>Astronium fraxinifolium</i> Schott em teste de procedências e progênes / Maiara Ribeiro Cornacini. -- Botucatu, 2025 102 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu Orientador: Celso Luis Marino 1. Conservação da diversidade das plantas. 2. Microssatélites (Genética). 3. Genética florestal. 4. Espécies florestais. 5. Plantas Genética molecular. I. Título.
-------	---



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: SISTEMA DE REPRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
Astronium fraxinifolium Schott EM TESTE DE PROCEDÊNCIAS E PROGÊNIES

AUTORA: MAIARA RIBEIRO CORNACINI

ORIENTADOR: CELSO LUIS MARINO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas
(Genética), área: Genética pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CELSO LUIS MARINO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Profa. Dra. ANANDA VIRGÍNIA DE AGUIAR (Participação Virtual)
Embrapa Florestas

Profa. Dra. MARÍLIA FREITAS DE VASCONCELOS MELO (Participação Virtual)
UFAL

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



Pesquisador Dr. MIGUEL LUIZ MENEZES FREITAS (Participação Virtual)
Instituto Florestal de São Paulo

Botucatu, 30 de agosto de 2021

Olga Maria Rauer Demant
Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Pós-Graduação

一期一会
(ichi go ichi e)
Provérbio japonês

Ofereço

Aos meus pais, Maria e João, por todo amor incondicional.

Dedico

Àqueles que mesmo diante das dificuldades impostas pela vida, em um país de desigualdades, resistiram, perseveraram e se tornaram doutores, não pelo título, mas por serem exemplos, idealistas e apaixonados pela ciência.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me concedeu perseverança e sabedoria na minha caminhada, que me presenteou com saúde e colocou pessoas maravilhosas ao meu redor.

À Nossa Senhora Aparecida, que sempre intercedeu por mim, me amparou em todos os momentos desafiadores e me manteve protegida em seu manto.

Ao Prof. Dr. Celso Luis Marino pela confiança depositada em mim, por aceitar me orientar e pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, por ser fonte de inspiração e superação e exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Mário Luiz Teixeira de Moraes pelos ensinamentos e incentivo desde a graduação, pelo grande pesquisador e incentivador de pessoas, por ser um exemplo de ser humano que ultrapassa o ambiente acadêmico.

Ao Dr. José Cambuim por todos os ensinamentos de campo desde a graduação, sempre me auxiliando e apoiando. Pelas trocas de experiências e muitas risadas, que com certeza fizeram do trabalho árduo do campo momentos divertidos.

Ao Dr. Bruno Cesar Rossini por estar disposto a ser um ótimo professor no dia a dia, pela paciência em me ensinar desde o primeiro dia no laboratório. Exemplo de dedicação e humildade.

Ao Me. Marcelo Augusto Mendes Alcantara pela amizade e parceria nas coletas de campo, no laboratório e nas inúmeras conversas que fizeram o trabalho ser divertido e inspirador.

Ao Dr. Ricardo de Oliveira Manoel, à Dra. Fernanda Bortolanza Pereira e à Dra. Silvelise Pupin pelo auxílio nas análises dos dados e ensinamentos que foram fundamentais para a conclusão do trabalho.

À Dra. Patrícia Ferreira Alves, à Dra. Aparecida Juliana Martins Corrêa e a Selma Maria Bozzite de Moraes por toda a ajuda no laboratório e pelas inúmeras conversas no decorrer do trabalho.

Aos membros das bancas examinadoras do exame de qualificação e defesa, Dra. Ananda Virginia de Aguiar, Dr. Bruno Cesar Rossini, Dr. Douglas Silva Domingues, Dra. Marília Freitas de Vasconcelos Melo, Dr. Mário Luiz Teixeira de Moraes e Dr. Miguel Luiz Menezes de Freitas, pelas contribuições que aperfeiçoaram este trabalho.

Aos funcionários da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNESP de Ilha Solteira por todo o apoio e auxílio em campo, principalmente ao Dr. Alexandre Marques da Silva e ao Alonso Ângelo da Silva.

Aos amigos de pós-graduação, principalmente à Dra. Daniele Fernanda Zulian e ao Dr. Darlin Ulises Gonzalez Zaruma pelas incontáveis conversas, desabafos e risadas ao longo desses anos.

À Ma. Camila Amaro dos Santos, pela amizade e parceria, por ter me recebido tão bem quando cheguei ao laboratório em Botucatu, à Ma. Francieli Alves Caldeira Saul pela amizade e companhia de aventuras e ao Dr. Murilo Serra pelos divertidos momentos.

À minha mãe, Maria Aparecida Ribeiro Cornacini, exemplo de fortaleza e que vence todos os dias a batalha para o “Sr. Parkinson”, ao meu pai, João Roberto Cornacini, que é fonte de alegria para nossa família e ao meu irmão, Caio Roberto Cornacini, que “segura as pontas” quando preciso. Apesar de nunca entenderem direito o porquê de eu estudar tanto, nunca deixaram de me apoiar e incentivar.

Aos meus amigos de longa data que entendem o meu sumiço, que nunca deixaram de me apoiar e acreditar em mim.

A Gabriel Rocha Nascimento, Maria Cláudia Rocha de Araújo e Deise Vieira Rocha, pelo apoio e incentivos imensuráveis, por serem fonte de compreensão e amor.

A João Pedro Marmol de Oliveira e a Cristiana Raach Bromberger que dividiram os momentos do dia a dia em Botucatu, compartilhando os cansaços, perrengues e as alegrias.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu e à pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética), aos seus docentes e funcionários pela oportunidade de realizar o doutorado e infraestrutura oferecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido – Código de Financiamento 001.

A todos que aqui não mencionei, mas fizeram parte desta caminhada, contribuindo para a conclusão deste trabalho e para meu crescimento profissional e pessoal. Sou muito grata a cada um que cruzou meu caminho, cada momento vivido, histórias contadas, histórias compartilhadas, experiências e ensinamentos, que com certeza fizeram a diferença.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

As formações florestais vêm sendo reduzidas a fragmentos cada vez menores, levando ao aumento da endogamia das populações e acarretando a diminuição do valor adaptativo de uma espécie. Desse modo, existe hoje uma demanda por conhecimento sobre espécies florestais nativas e também de sementes com qualidade genética, consideradas ferramentas essenciais para fins de reflorestamento e recuperação ambiental. Devido à excelente qualidade da sua madeira, a *Astronium fraxinifolium* é uma espécie muito explorada, sendo necessária a conservação *ex situ* e a elaboração de estratégias que garantam a conservação da espécie e da sua variabilidade genética. Diante disso, o trabalho foi realizado com o objetivo de estimar o sistema reprodutivo da espécie a partir de progênies oriundas de um teste de procedências e progênies (TPP) de duas populações de *A. fraxinifolium* e avaliar a diversidade genética produzida no referido TPP por meio de marcadores microssatélites (SSR), bem como seu tamanho efetivo levando em consideração a proporção sexual dos indivíduos em cinco eventos reprodutivos. Houve um aumento na quantidade de indivíduos em florescimento aos longo dos anos no TPP e a espécie apresenta padrão de florescimento anual, que floresce todos os anos, tanto em nível individual quanto em populacional. A proporção sexual ficou próxima de 1:1 no evento reprodutivo de 2018 para as duas procedências, SP e MS e, consequentemente houve aumento do tamanho efetivo, no qual a procedência de MS se mostrou mais adaptada ao local que a de SP, apresentando um tamanho efetivo maior. Foram desenvolvidos 20 marcadores SSR que mostraram níveis suficientes de polimorfismo para uso como ferramentas de estudos de genética populacional ecológica, sendo os primeiros a serem desenvolvidos para a espécie. Desses marcadores, oito foram utilizados para caracterizar as populações (1.097 indivíduos), regenerantes do TPP foram coletados no evento reprodutivo de 2017 (21 anos de idade). O número total de alelos variaram de 51 a 108 e valores de heterozigosidades observados foram altos ($>0,71$) o que demonstram que estas populações conservam índices de diversidade genética consideravelmente altos. Os cruzamentos em sua maioria foram aleatórios, porém 20% dos indivíduos de MS e 11% de SP são irmãs-completas, sendo o coeficiente de coancestria dentro de progênies de 0,152 para MS e 0,142 para SP, valores superiores ao esperado em progênies de meias-irmãs (0,125). Visando à utilização dessas sementes para reflorestamentos para garantir um tamanho efetivo de população de 150, será necessário coletar sementes de no mínimo 49 árvores matrizes. De um modo geral, a conservação *ex situ* foi suficiente para manter a diversidade genética das populações para fins de conservação. Um manejo do teste é recomendado, com intuito de evitar endogamia, mas este deve levar em consideração a proporção sexual dentro de família. Além disso, as informações obtidas são inéditas para a espécie e auxiliam em planos de conservação e melhoramento genético, não somente para *A. fraxinifolium*, mas também para sementes de outras espécies produzidas em conservações *ex situ*.

Palavras-chave: Gonçalves-alves, Conservação genética; Marcadores microssatélites; Espécie florestal; Nativa do Cerrado.

ABSTRACT

Forest formations have been reduced to smaller fragments, leading to an increase in the inbreeding of populations and also leading to a decrease in the adaptive value of a species. Thus, there is today a demand for knowledge about native forest species and also seeds with genetic quality, considered essential tools for reforestation and environmental recovery purposes. Due to the excellent quality of its wood, *Astronium fraxinifolium* is a highly exploited species, requiring *ex situ* conservation and the development of strategies to ensure the conservation of the species and its genetic variability. Therefore, the work was carried out with the objective of knowing the reproductive system of the species through progenies from a provenance and progeny test (PTT) of two populations of *A. fraxinifolium* from the Faculty of Engineering of Ilha Solteira/Unesp located in city of Selvíria-MS and evaluate the genetic diversity produced in that PTT through microsatellite markers (SSR), as well as its effective size taking into account the sexual identification of individuals in five reproductive events. PTT showed increased flowering throughout reproductive events with characteristics of annual flowering for the species. The sex ratio was close to 1:1 in the 2018 reproductive event for the two provenances, SP and MS, and consequently there was an increase in the effective size, in which the provenance of MS was more adapted to the location than that of SP, presenting a larger effective size. Twenty SSR markers were developed that showed sufficient levels of polymorphism to be used as tools in ecological population genetic studies, being the first to be developed for the species. Of these markers, eight were used to characterize the populations (1,097 individuals), regenerating PTT were collected in the reproductive event of 2017 (21 years of age). The total number of alleles (51 to 108) and high heterozygosity values (>0.71) observed showed that these populations conserve considerably high rates of genetic diversity. The crossings were mostly random, but 20% of individuals from MS and 11% from SP are full-sibs, with the coancestry coefficient within progenies of 0.152 for MS and 0.142 for SP, values higher than expected in progenies of half-sibs (0.125). In order to use these seeds for reforestation to ensure an effective population size of 150, it will be necessary to collect seeds from at least 49 trees. In general, *ex situ* conservation was sufficient to maintain the genetic diversity of populations and for conservation purposes. A test management is recommended, with the aim of avoiding inbreeding, but this must take into account the sex ratio within the family. In addition, the information obtained is unprecedented for the species and helps in conservation and genetic improvement plans, not only for *A. fraxinifolium*, but also for seeds produced in *ex situ* conservation.

Keywords: Gonçalves-alves, Genetic conservation; Microsatellite markers; Forest species; Native to the Cerrado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 A espécie <i>Astronium fraxinifolium</i> Schott.....	4
3.2 Florescimento e tamanho efetivo populacional em plantios de espécies arbóreas dioicas nativas	7
3.3 Marcadores moleculares microssatélites (SSRs).....	8
3.4 SSRs em espécies arbóreas do cerrado.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	2
4. CAPÍTULO 1	13
FLORESCIMENTO DE <i>Astronium fraxinifolium</i> SCHOTT (ANACARDIACEAE) EM TESTE DE PROCEDÊNCIAS E PROGÊNIES.....	13
4.1 INTRODUÇÃO	14
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.2.1 Material	15
4.2.2 Métodos	17
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.4 CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
5. CAPÍTULO 2.....	34
DESENVOLVIMENTO DE 20 MARCADORES SSRs DERIVADOS DE cDNA PARA <i>Astronium fraxinifolium</i> SCHOTT (ANACARDIACEAE)	34
5.1 INTRODUÇÃO.....	35
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.2.1 Coleta de amostra e extração de DNA para validação	36
5.2.2 Identificação e caracterização de loci SSR	36
5.2.3 Análise estatística populacional.....	37
5.3 RESULTADOS.....	38

5.3.1 Identificação e classificação de marcadores SSR	38
4.3.2 Diversidade genética de populações naturais	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
6. CAPITULO 3	51
DIVERSIDADE GENÉTICA E SISTEMA DE REPRODUÇÃO DE <i>Astronium fraxinifolium</i> Schott EM TESTE DE PROCEDÊNCIAS E PROGÊNIES	51
6.1 INTRODUÇÃO	52
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	53
6.2.1 Material	53
6.2.1.1 Histórico da área	53
6.2.1.2 Coleta e implantação do teste	55
6.2.1.3 Regenerantes	56
6.2.2 Métodos	59
6.2.2.1 Extração e amplificação do DNA e genotipagem dos indivíduos	59
6.2.2.2 Análise dos dados	60
a) Diversidade genética	60
b) Sistema de reprodução	60
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
6.3.1 Diversidade genética	62
6.3.2 Sistema de reprodução	68
6.4 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	77

1. INTRODUÇÃO

Entre os biomas com grande biodiversidade do Brasil encontra-se o Cerrado, a mais rica savana do mundo, com recursos hídricos valiosos para o Brasil, considerado um dos “hotspots” mundiais com áreas prioritárias para conservação (MYERS et al., 2000). Apesar da sua importância ambiental e social, devido à pressão antropogênica principalmente ao desmatamento para fins agrícolas, a vegetação do Cerrado é frequentemente degradada, além disso muitas áreas estão localizadas fora de reservas naturais (CADDADH et al., 2013).

Decorrente disso, as formações florestais são reduzidas a fragmentos cada vez menores e mais dispersos em meio às áreas antropizadas. Algumas áreas são tão exploradas que as espécies florestais que as compõem são encontradas, restritamente, à margem de rodovias ou em pequenas reservas ecológicas, um exemplo é o gonçalo-alves – *Astronium fraxinifolium* – que habita naturalmente a região de transição de Floresta Estacional Semidecidual e o Cerrado (LORENZI, 1998; AGUIAR et al., 2001). Além disso, a espécie é muito explorada devido à excelente qualidade da sua madeira (LORENZI, 1998; NETO, 2009). Portanto, somente a conservação *in situ* não contribui para sua sobrevivência em ambientes totalmente degradados e desconectados, fazendo-se necessária a conservação *ex situ* e a elaboração de estratégias que garantam a conservação da espécie e da sua variabilidade genética.

Nesse sentido, foram implantados testes de procedências e progênies de *A. fraxinifolium* na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da FEIS/Unesp. Neles há a representação de populações de margens de rodovia com perturbação antrópica da respectiva região. Esses testes foram estabelecidos em diferentes arranjos: misto intercalado com uma espécie (AGUIAR, 2001), misto com três espécies (OTSUBO et al., 2015) e em plantio homogêneo (MISSIO et al., 2002).

Porém, somente a conservação *ex situ* não garante a conservação da espécie. Para uma conservação mais efetiva recomenda-se o uso de sementes produzidas a partir desses testes (SEBBENN et al., 2009). Mas, para que seja possível fornecer sementes, é preciso conhecer a base genética e a qualidade genética de suas sementes (BERTONHA et al., 2016; CANUTO et al., 2017) para delinear estratégias de coleta. Ademais, *A. fraxinifolium* é uma opção para o reflorestamento e manejo de áreas degradadas (MISSIO

et al., 2002; CALGARO et al., 2015), o que pode vir a suprir a demanda por sementes florestais para cumprimento de compensações ambientais e restauração de áreas.

Segundo Glasenapp et al. (2014) a avaliação da diversidade genética é considerada vital para a formulação de estratégias de conservação, principalmente para espécies ameaçadas de extinção. Apenas com a conservação da diversidade genética poderão ser mantidos os processos evolutivos atuantes nas populações. Além disso, informações sobre os processos reprodutivos devem ser considerados para uma conservação *ex situ* efetiva, uma vez que são importantes para auxiliar nas tomadas de decisão do manejo florestal, a fim de garantir a reprodução e manutenção da diversidade genética das espécies nas áreas manejadas (MAUÉS; OLIVEIRA, 2010), sendo a identificação de padrões fenológicos de floração e frutificação importante subsídio para planos de manejo e conservação de espécies vegetais (CESÁRIO; GAGLIANONE, 2008), principalmente para espécies dioicas, em que o tamanho da população reprodutiva e a proporção desigual entre os sexos são fatores que alteram o tamanho efetivo populacional (VENCOVSKY et al., 2012).

Entre as formas para avaliar a diversidade destaca-se a caracterização molecular, que permite inferir sobre o grau de diversidade entre indivíduos e entre populações. Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na caracterização de germoplasma, principalmente por fornecer informações livres dos efeitos ambientais (CASTRO et al., 2004; CHIORATO et al., 2007). Atualmente os marcadores moleculares microsatélites (SSRs) são utilizados para avaliar a diversidade genética e a estruturação inter e intrapopulacional. Esses são codominantes, o que possibilita estimar parentescos, hibridização e parâmetros populacionais. Portanto, o desenvolvimento de marcadores é útil para trabalhos populacionais em espécies das quais não há nenhuma informação prévia, e ainda vem sendo facilitado pelos novos métodos baseados em sequenciamento de nova geração (NGS). Apesar do custo relativamente alto para seu desenvolvimento, os SSRs espécie-específicos abrem ampla gama de potencialidades de pesquisa que podem colaborar para a conservação de várias espécies.

Nesse sentido, a caracterização molecular de progênies de *A. fraxinifolium* provenientes de um teste de procedências e progênies possibilita que por meio de novas tecnologias sejam fornecidas informações sobre a diversidade genética produzida em conservações *ex situ* de espécies florestais, além de uma visão geral dos mecanismos de reprodução e distribuição da variabilidade genética, até então inéditas para a espécie.

2. OBJETIVO

Visando fornecer subsídios para a conservação genética e planos de manejo para a espécie *A. fraxinifolium*, o trabalho teve como objetivo geral responder às seguintes questões: a) Qual a diversidade genética presente em um teste de procedências e progênies? b) A diversidade genética entre e dentro das populações de *A. fraxinifolium* procedentes de Mato Grosso do Sul e de São Paulo foram conservadas?

Para gerar informações que permitem responder às perguntas acima, os objetivos específicos foram:

- I. verificar o florescimento e a identificação de árvores de flores femininas e masculinas de *A. fraxinifolium* no teste de procedências e progênies em Selvíria - MS;
- II. desenvolver marcadores tipo microssatélites (SSRs) a partir de biblioteca de cDNA de *A. fraxinifolium*;
- III. estimar o sistema reprodutivo nas duas populações de *A. fraxinifolium* com base em parâmetros obtidos na análise molecular por locos SSR;
- IV. conhecer a representatividade das populações de *A. fraxinifolium* fundamentando-se no tamanho efetivo populacional, para subsidiar programas de conservação da espécie;
- V. determinar estratégia adequada para a coleta de sementes no teste de procedências e progênies de *A. fraxinifolium* para fornecimento de sementes com qualidade genética.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A espécie *Astronium fraxinifolium* Schott.

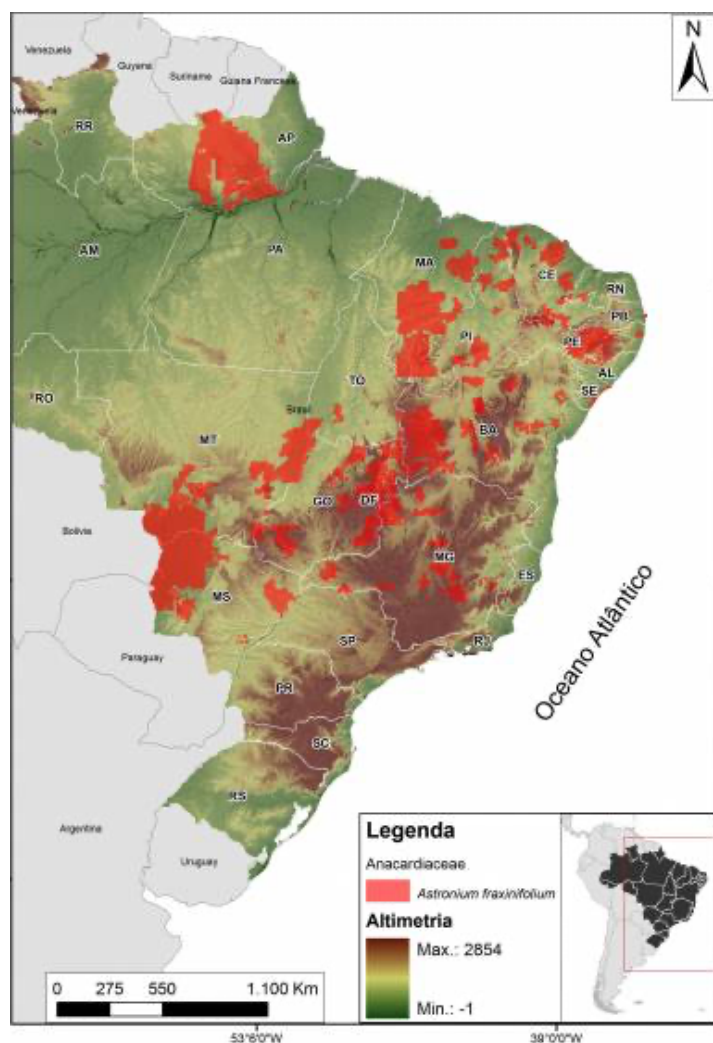
A família Anacardiaceae Lindl. inclui mais de 800 espécies em 82 gêneros e é de distribuição principalmente pantropical. Algumas de suas espécies são cultivadas em todo o mundo principalmente por seus frutos e sementes comestíveis, como as mangas (*Mangifera indica* L. e outras espécies), pistache (*Pistacia vera* L.), castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.), pimenta rosa (*Schinus terebinthifolia* L.) e marula da África (*Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. Também inclui espécies com compostos medicinais e madeira valiosa (PELL, 2004; PELL et al., 2011). Dos 32 gêneros nativos da América, 77% das espécies são endêmicas (SILVA-LUZ; PIRANI, 2010). Algumas espécies da família, valorizadas por sua madeira de qualidade e resistência à podridão, são de gêneros sul-americano como o *Schinopsis*, que tem sido amplamente utilizado na Argentina. Outros gêneros madeireiros incluem: *Abraia* ined., *Anacardium* L., *Astronium*, *Camposperma* Thwaites, *Dracontomelon* (Blo.) Merr e Rolfe, *Lannea*, *Loxopterygium*, *Myracrodruon*, *Ozoroa*, *Protorhus* Engl., *Schinopsis*, *Sclerocarya* Hochst., *Trichoscypha* (RANDRIANASOLO, 1998).

No gênero pertencente à família Anacardiaceae está o *Astronium*, estabelecido por Jacquin em 1760. As árvores do gênero, além de importantes componentes da vegetação em diversos ambientes, são produtoras de madeira compacta, de excelente qualidade, com alto conteúdo de tanino, o que confere muita resistência à decomposição e imputrescibilidade quando por muito tempo em contato com o solo (SANTIN, 1989; MARÍN; FLORES, 2002; CARVALHO, 2006). O centro de origem e diversidade do gênero é o Brasil, onde encontram-se sete das oito espécies, elas são: *A. graveolens*, *A. fraxinifolium*, *A. ulei*, *A. lecointei*, *A. glazziovi*, *A. obliquum* e *A. nelson-rosae* (SANTIN, 1989).

Das espécies destaca-se *Astronium fraxinifolium* Schott, também conhecida como gonçalo-alves. A espécie é uma planta decídua, heliófita, pioneira, seletiva xerófila e dioica. Floresce durante os meses de agosto e setembro, com a planta despida de sua folhagem (LORENZI, 1998). A polinização é entomófila (ALLEM, 1991) e a frutificação ocorre entre outubro e novembro, sendo a dispersão anemocórica (REYS et al., 2005). O cálice, que é persistente e acrescente no fruto, apresenta cinco sépalas, resultando em

aspecto estrelado, sendo esta a característica que dá nome ao gênero e também facilita a dispersão pelo vento (MARÍN; FLORES, 2002; CARVALHO, 2006). Além da qualidade de sua madeira (LEITE, 2002), a espécie também possui casca adstringente e as folhas possuem ação antisséptica, indicadas no tratamento de diversas doenças (JENRICH, 1989).

Figura 1. Distribuição de *A. fraxinifolium* Schott na América do Sul.



Fonte: CNCFlora

Astronium fraxinifolium foi muito explorada para uso na construção civil, naval e na fabricação de mobiliário de luxo (LORENZI, 1998; NETO, 2009). A espécie que tem ocorrência ampla, mas principalmente no cerrado (Figura 1) (LORENZI, 1998, LEITE, 2002), já esteve na Portaria IBAMA n. 37-N, de 3 de abril de 1992, indicada como ameaçada de extinção na categoria vulnerável, apesar de não ser descrita na portaria n 443, de 17 de dezembro de 2014 como espécie ameaçada. Em Goiás a espécie aparece no

documento da Assembleia Legislativa do Estado na Redação dada pela Lei nº 14.334, de 26-11-2002. Art. 10 com exploração permitida apenas sobre plano de manejo autorizado, acompanhado de estudo prévio de avaliação de impacto ambiental. Entre os anos de 2006 e 2016 foi registrado um volume de madeira de cortes autorizados de 484 m³ no Pará a R\$156,00 o m³ (SEMA-PA, 2016) (Tabela 1) e entre os anos de 2006 e 2011, 1642,68 m³ no Mato Grosso (SEMA-MT, 2011), o que mostra demanda na exploração da madeira.

Santos et al. (2007) verificaram baixa frequência de *A. fraxinifolium* em remanescentes de florestas estacionais decíduas no domínio do cerrado, quando comparado com outras espécies, e Silva-Luz e Pirani (2011) não registraram a espécie no levantamento de Anarcadiaceae no estado de São Paulo. Segundo Leite (2002) e o Ministério do Meio Ambiente (2011), a espécie carece de dados, portanto, estudos detalhados da biologia reprodutiva, e demografia de povoamentos naturais de *A. fraxinifolium* são urgentemente necessários. Leite (2002) recomenda que, como áreas de conservação *in situ* ou para planejamento *ex situ*, principalmente a Amazônia (região de Santarém), no Estado do Pará; o Centro-Sul, na fronteira Brasil – Paraguai; e o interior do Estado de São Paulo sejam priorizados, devido à antropização e à ausência de conservação de *A. fraxinifolium* nessas regiões.

Astronium fraxinifolium é indicada como opção para o reflorestamento e manejo de áreas degradadas, uma vez que encontram-se indivíduos nesses ambientes, inclusive com potencial para regeneração (MISSIO et al., 2002; CALGARO et al., 2015; MANOEL et al., 2021), justificando a busca pelo conhecimento a respeito da espécie e por estratégias de conservação.

Tabela 1. Extração e movimentação de toras de madeira nativa com classificação por espécie vegetal, o volume em metros cúbicos e o valor comercializado para o gênero *Astronium* no estado do Pará registrados pela secretaria do meio ambiente do Pará de 2006 a 2016.

Espécie	Valor R\$	Volume em m ³	Valor Médio R\$
<i>Astronium fraxinifolium</i> Schott	75.673,17	484,7013	156,00
<i>Astronium gracile</i> Engl.	6.843.281,89	48.419,1578	141,00
<i>Astronium lecointei</i> Ducke	68.418.277,16	416.624,5932	164,00
<i>Astronium macrocalyx</i> Engl.	79.960,18	689,4270	115,00
<i>Astronium</i> sp.	1.849.837,50	14.161,1249	130,00
<i>Astronium ulei</i> Mattick	16.711.497,41	105.514,1399	158,00
<i>Astronium urundeuva</i> (Allemão) Engl.	1.070.140,90	7.115,8277	150,00
<i>Astronium lecointei</i> Ducke	624.945,67	7.128,5221	87,00
<i>Astronium lecointei</i> Ducke	90.505,96	712,7061	126,00
Total	95.764.119,84	600850,20	Média: 141,00

3.2 Florescimento e tamanho efetivo populacional em plantios de espécies arbóreas dioicas nativas

A conservação *ex situ* por meio de testes de procedências e progênies ou pomares de sementes é uma forma complementar da conservação *in situ* e tem como objetivo a manutenção do potencial evolutivo das espécies. Com a conservação da variabilidade genética, são mantidas as condições para a adaptação às mudanças ambientais, sejam elas naturais, econômicas ou sociais (FRANKEL, 1977; SEBBENN et al., 2004).

Informações sobre os processos reprodutivos de espécies arbóreas tropicais devem ser consideradas para uma conservação *ex situ* efetiva, uma vez que são importantes para auxiliar nas tomadas de decisão do manejo florestal, a fim de garantir a reprodução e manutenção da diversidade genética das espécies nas áreas manejadas (MAUÉS; OLIVEIRA, 2010), e ainda, considerando que o período reprodutivo é uma fase importante para a dinâmica populacional, a identificação de padrões fenológicos de floração e frutificação é importante como subsídio para planos de manejo e conservação de espécies vegetais (CESÁRIO; GAGLIANONE, 2008), principalmente para espécies dioicas, em que o tamanho da população reprodutiva e a proporção desigual entre os sexos são fatores que alteram o tamanho efetivo populacional (VENCOVSKY et al, 2012).

A forma como as espécies recombina seus genes a cada evento reprodutivo e formam as populações descendentes é um ponto importante a ser conhecido e são fundamentais para o delineamento de estratégias para a conservação e uso dessas espécies, permitindo realizar previsões mais realistas (MORI et al., 2013). Apesar de alguns estudos realizados (Tabela 2), informações sobre o florescimento de espécies arbóreas nativas em plantios, compostos de populações conservadas *ex situ*, são escassas, consequentemente faltam informações mais precisas sobre a razão sexual e tamanho efetivo destes.

Por meio desses poucos estudos (SANT'ANA, 2017; SILVA et al., 2018; RIVA, 2020; SAUL, 2020, ZULIAN et al., 2021), é possível inferir que a proporção sexual está em função das populações, de sua procedência, do sistema de plantio, do tamanho amostral e da idade dos indivíduos em que a avaliação é efetuada (ZULIAN et al., 2021). Em todos os casos nota-se que o florescimento influencia diretamente no tamanho efetivo e, por serem testes de procedências e progênies, é necessária a investigação da endogamia, pois em espécies dioicas a endogamia pode ocorrer por meio de cruzamentos entre

parentes (MANOEL et al., 2015) e quando há número reduzido de parceiros locais para cruzamento (VRANCKX et al., 2012).

Tabela 2. Florescimento e tamanho efetivo de espécies florestais dioicas plantadas. N_m : número de árvores de flores masculinas, N_f : número de árvores de flores femininas e N_e : tamanho efetivo populacional.

Espécie	Local	Idade (anos)	Total plantadas	Total floresceram	N_m	N_f	N_e	Fonte
<i>Araucaria. angustifolia</i>	Colombo/PR	32	210	80	40	40	55	Silva et al., 2018
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	DES - Selvíria/MS	12	270	93	75	18	33	Saul, 2020
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	MEU- Selvíria/MS	12	420	243	151	92	158	Saul, 2020
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Bauru - Selvíria/MS	31	840	597	350	247	443	Riva, 2020
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Sel- Selvíria/MS	31	840	578	339	239	421	Riva, 2020
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Selvíria/MS	29	665	227	206	21	77	Sant'ana, 2017
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Bauru/SP	29	682	236	192	44	114	Sant'ana, 2017
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Petrolina/PE	24	1114	36	22	14	31	Sant'ana, 2017
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Paulo de Faria/SP	19	747	300	227	73	222	Sant'ana, 2017
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Seridó/RN	19	524	157	109	48	133	Sant'ana, 2017
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Itarumã/GO	12	955	685	437	248	634	Sant'ana, 2017
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	POB- Selvíria/MS	31	1208	1208	539	669	1.195	Zulian et al., 2021
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	APSS- Selvíria/MS	31	878	878	373	505	872	Zulian et al., 2021

3.3 Marcadores moleculares microssatélites (SSRs)

Os marcadores moleculares microssatélites (SSRs) são *motifs* curtos (um a seis nucleotídeos) de DNA repetidos em tandem localizados ao longo de genomas eucarióticos (LI et al., 2002; ZANE et al., 2002) em regiões codificantes e não codificantes do DNA (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2013; PHUMICHAH et al., 2015). Eles são utilizados para diversas finalidades como: mapeamento do genoma, forense, análise de parentesco, genética de conservação, identificação do parentesco de poliploides, filogeografia e genética de populações (ELLEGREN, 2000; ESSELINK et al., 2004; KALIA et al., 2011; ANTIQUEIRA et al., 2013; ZARGAR et al., 2015; VIEIRA et al., 2016).

Os SSRs são altamente informativos, codominantes, marcadores genéticos de múltiplos alelos que são reprodutíveis e transferíveis, experimentalmente, entre espécies relacionadas, o que fez serem os marcadores mais amplamente usados para genotipagem de plantas (BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006; MASON, 2015). Também são úteis para espécies nativas, nas quais pretende-se estudar a diversidade com base na distância genética; estimar o fluxo gênico e as taxas de cruzamento; e em estudos evolutivos, sobretudo para inferir relações genéticas infraespecíficas (KALIA et al., 2011; VIEIRA et al., 2016).

Essa aplicabilidade se deve ao seu alto nível de polimorfismo e taxa de mutação por locos por geração (LI et al., 2002), o que o torna instrumento eficiente para avaliar a similaridade genética entre indivíduos ou táxons intimamente relacionados (GUICHOUX et al., 2011; KALIA et al., 2011). Os polimorfismos observados em SSRs são os resultados de diferentes números de repetições dos *motifs* causado por derrapagem da polimerase na replicação do DNA ou por erros de recombinação (OLIVEIRA et al., 2006). Quanto mais longa e pura a repetição, mais alta a frequência de mutação. As mutações que evitam a correção pelo sistema de reparo de incompatibilidade de DNA formam novos alelos nos locos SSRs. Por esta razão, diferentes alelos podem existir em um determinado loco SSR, o que significa que os SSRs são mais informativos do que outros marcadores moleculares, incluindo SNPs (VIEIRA et al., 2016).

Como os SSRs e suas regiões flangeadoras evoluem com relativa rapidez, os locos geralmente precisam ser desenvolvidos pelo pesquisador especificamente para a espécie de interesse ou congêneros (GUICHOUX et al., 2011). Para muitos projetos de pesquisa, o desenvolvimento de locos podem ser a parte mais cara do orçamento (WEI et al., 2014; HODEL et al., 2016b). No entanto, os avanços feitos com sequenciamento de nova geração (NGS) proporcionaram um novo cenário para a detecção de SSRs. Vários projetos baseados em NGS foram desenvolvidos ao longo das últimas décadas, gerando uma enorme quantidade de sequências que foram disponibilizadas em bancos de dados públicos e amplamente utilizadas para a prospecção de SSRs (VIEIRA et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

Com o advento do NGS, sequenciar o genoma ou transcriptoma se tornou a maneira mais fácil de identificar locos SSRs, substituindo o uso do método de Sanger, assim como o uso de bibliotecas genômicas enriquecidas com sequências contendo SSRs (ZALAPA et al., 2012; TAHERI et al., 2018). Neste sentido, NGS vêm sendo amplamente utilizados para este fim (GROHME, et al., 2013; VIEIRA et al., 2016). A tecnologia de

RNA-Seq gera grandes quantidades de dados de sequência expressa, ainda que não sejam organismos modelo e sem genoma de referência (BRAUTIGAM et al., 2011) e ainda, a vantagem de desenvolver marcadores SSRs a partir de sequências transcritas, inclui a possibilidade de encontrar associações de genes com fenótipos (LI et al., 2002). A detecção de microssatélites em transcritos e regiões reguladoras do genoma estimulou o interesse científico em descobrir suas possíveis funções biológicas. Muitas publicações têm apresentado evidências de que os SSRs desempenham um papel em processos relevantes, como a regulação da transcrição e tradução, organização da cromatina, tamanho do genoma e do ciclo celular (NEVO, 2001; LI et al., 2004; GAO et al., 2013). Também são relevantes para a adaptação populacional e a plasticidade fenotípica dentro e através das gerações onde as repetições em tandem associadas a genes atuam como facilitadores evolutivos, o que proporciona variação abundante e robusta, e permite rápido desenvolvimento de novas formas (NEVO, 2001; KASHI; KING, 2006). Neste sentido, Hodel et al. (2016a) salientam que os estudos atuais e futuros de SSRs devem ter cuidado ao fazer suposições sobre a neutralidade de locos SSRs, independentemente de serem derivados de dados genômicos ou transcriptômicos.

Os SSRs têm sido, e ainda permanecem, uma opção viável para a coleta de dados genéticos, principalmente para pesquisadores com orçamentos limitados, como cientistas conservacionistas, estudantes e pesquisadores em países em desenvolvimento (JENNINGS et al., 2011, NARUM et al., 2013, HODEL et al., 2016a). Além disso, para algumas espécies nativas já existem SSRs desenvolvidos, que podem continuar a ser utilizados para investigações futuras.

3.4 SSRs em espécies arbóreas que ocorrem no cerrado

O desmatamento é um fato na maioria das regiões tropicais. Dentro dos biomas, as florestas tropicais foram reduzidas a fragmentos florestais, ou transformadas em pastagens ou áreas de culturas agrícolas (ASNER et al., 2005; SEBBENN et al., 2008; LACERDA et al., 2008). O Cerrado, entre os seis biomas brasileiros, é o segundo maior em extensão, cerca de 23% do território brasileiro (BRIDGEWATER et al., 2004; KLINK; MACHADO, 2005), é um dos biomas mais ameaçados de extinção do mundo, classificado como um *hotspot* de biodiversidade (MYERS et al., 2000). Localiza-se desde as fronteiras meridionais da floresta amazônica até as áreas do sul dos estados de São Paulo e noroeste do Paraná, e compreende várias fisionomias, desde pastagens secas

até florestas (OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 2002). Devido à pressão antropogênica, e principalmente ao desmatamento para fins agrícolas, a vegetação do Cerrado é frequentemente degradada. No estado de São Paulo todas as manchas do Cerrado estão localizadas fora de reservas naturais (CADDADH et al., 2013).

Os impactos do desmatamento em espécies florestais são acentuados, as populações de árvores nesses locais são perdidas e populações de espécies em áreas adjacentes são isoladas em fragmentos florestais (SEBBENN et al., 2008). Portanto, há redução de populações nos ambientes e uma diminuição no potencial genético adaptativo (LOWE et al., 2005). A análise genética com base em ferramentas moleculares pode auxiliar no entendimento da dinâmica populacional das espécies, fornecendo dados sobre diversos parâmetros evolutivos importantes, incluindo os níveis de variabilidade genética, a magnitude da distribuição desta variabilidade dentro e entre as populações, níveis de endogamia, taxa de fecundação cruzada e autofecundação, tamanho efetivo populacional e taxa de migração (HEDRICK, 2001, AGARWAL et al., 2008, ECKERT et al., 2010), bem como sobre processos históricos e padrões de distribuição no espaço geográfico em grande escala (DINIZ-FILHO et al., 2008, 2009).

Todas essas informações podem ser utilizadas para o desenvolvimento de metodologias de modo a estabelecer estratégias de conservação *in situ* e *ex situ* e definir populações prioritárias para conservação com base em dados genético-moleculares (DINIZ-FILHO; TELLES 2002, DINIZ-FILHO et al., 2012). Neste sentido, as técnicas moleculares têm sido utilizadas para caracterizar os níveis de variabilidade genética bem como avaliar a estrutura genética nas populações de plantas que ocorrem no bioma Cerrado, para tanto marcadores SSRs foram desenvolvidos para diversas espécies arbóreas desse bioma nos últimos anos (Tabela 3).

Tabela 3. Espécies de plantas que ocorrem no Cerrado com marcadores microsatélites desenvolvidos/transferidos.

Espécie	Referência bibliográfica
<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.	Nucci et al. 2008, Mengitsu et al. 2016
<i>Acrocomia emensis</i> Toledo	Neiva et al. 2016
<i>Alibertia edulis</i>	Dantas et al. 2019
<i>Anacardium humile</i> A. St.-Hil.	Cota et al. 2012
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan.	Feres et al. 2012
<i>Annona coriacea</i> Mart.	Ribeiro et al. 2014
<i>Annona crassiflora</i> Mart.	Pereira et al. 2008
<i>Byrsonima cydoniifolia</i>	Bernardes et al. 2014
<i>Campomanesia adamantium</i>	Crispin et al. 2019
<i>Cariniana estrellensis</i> (Raddi) Kuntze.	Guidugli et al. 2010
<i>Caryocar brasiliense</i> Cambess.	Collevatti et al. 1999
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.	Cavallari et al. 2008
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Ciampi et al. 2000
<i>Dimorphandra mollis</i> Benth.	Souza et al. 2012
<i>Dipteryx alata</i> Vogel.	Soares et al. 2012, Guimarães et al. 2017
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong	Moreira et al. 2012
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	Telles et al. 2013
<i>Eugenia uniflora</i> O. Berg	Ferreira-Ramos et al. 2008
<i>Euterpe edulis</i> Mart.	Gaiotto et al. 2001
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	Rodrigues et al. 2015
<i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) Plumel	Baldauf et al. 2011
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Ciampi et al. 2008
<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne	Ciampi et al. 2008
<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.	Caddah et al. 2009
<i>Kielmeyera grandiflora</i> (Wawra) Saddi	Caddah et al. 2013
<i>Luehea divaricata</i> Mart.	Ruas et al. 2009
<i>Mauritia flexuosa</i> L. f.	Menezes et al. 2012
<i>Metrodorea nigra</i> A. St.-Hil.	Guidugli et al. 2012
<i>Moldenhawera blanchetiana</i>	Vivas et al. 2015
<i>Moldenhawera luschnathiana</i>	Vivas et al. 2015
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	Souza et al. 2018
<i>Parapiptadenia rigida</i> (Benth.) Brenan	Costa et al. 2012
<i>Plathymentia reticulata</i> Benth.	Cruz et al. 2012, Oliveira et al. 2012
<i>Qualea grandiflora</i> Mart.	Ritter et al. 2012
<i>Tabebuia aurea</i> Benth. & Hook. f. ex S. Moore	Braga et al. 2007
<i>Tabebuia roseoalba</i> (Ridl.) Sandwith	Feres et al. 2009

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEM, A.C. **Estudo da biologia reprodutiva de duas espécies florestais (aroeira e gonçalo-alves) da região do cerrado**. Brasília, DF: Embrapa/CENARGEN, 1991. p. 1-5.
- AGUIAR, A.V. **Variação genética em progênies de *Astronium fraxinifolium* Schott e *Jacaranda cuspidifolia* Mart. em consorcio**. 2001. 126 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2001.
- AGUIAR, A.V.; BORTOLOZO, F.R.; MORAES, M.L.T.; SÁ, M.E. Determinação de parâmetros genéticos em população de gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium*) através das características fisiológicas da semente. **Ciência Florestal**, v, 1, n.60, p. 89-97. 2001.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant cell reports**, 27(4), 617-631. 2008.
- ANTIQUERA, L.M.O.R. Application of Microsatellite Molecular Markers in Studies of Genetic Diversity and Conservation of Plant Species of Cerrado. **J. Plant Sci.**, 1, 1–5. 2013.
- ASNER, G.P.; KNAPP, D.E.; BROADBENT, E.N.; OLIVEIRA, P.J.C.; KELLER, M.; SILVA, J.N. Selective logging in the Brazil Amazon. **Science** 130, 480–482. 2005.
- BALDAUF, C.; CIAMPI, M.B.; VIGNA, B.B.; MORI, G.M.; GUEDES, J.P.; SOUZA, A.P.; SANTOS, F.A.D. Characterization of microsatellite locos in *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae), a medicinal plant from the Brazilian savanna. **American journal of botany**, 98(9), e244-e246. 2011.
- BERNARDES, V.; ANJOS, D.E.; GONDIM, S.G.D.C.A.; MURAKAMI, D.M.; BIZÃO, N.; TELLES, M.P.D.C. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Byrsonima cydoniifolia* (Malpighiaceae) and cross-amplification in *B. crassifolia*. **Applications in plant sciences**, 2(5), 1400016. 2014.
- BERTONHA, L.J.; FREITAS, M.L.M.; CAMBUIM, J.; MORAES, M.L.T.; SEBBENN, A. M. Seleção de progênies de *Myracrodruon urundeuva* baseada em caracteres fenológicos e de crescimento para reconstituição de áreas de Reserva Legal. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 44, n. 109 p. 95104, 2016.
- BRAGA, A.C.; REIS, A.M.; LEOI, L.T.; PEREIRA, R.W.; COLLEVATTI, R.G. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, 7(1), 53-56. 2007.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. **Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros por Satélite**. Acordo de Cooperação Técnica MMA/IBAMA: Monitoramento do Bioma Cerrado 2008 a 2009, Brasília, DF, p.55, 2011.
- BRAUTIGAM, A.; MULLICK, T.; SCHLIESKY, S.; WEBER, A.P.M. Critical assessment of assembly strategies for non-model species mRNA-Seq data and application

of next- generation sequencing to the comparison of C(3) and C(4) species, *J. Exp. Bot.*, vol. 62 (9), pp. 3093-3102, 2011.

BRIDGEWATER, S.; RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F. Biogeographic patterns, biodiversity and dominance in the cerrado biome of Brazil. *Biodiv. Conserv.* 13:2295-2318, 2004.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N.J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays*, 28, 1040–1050. 2006.

CADDAH, M.K., CAMPOS, T., SFORÇA, D.A., SOUSA, A.C., AMARAL, M.C.E., BITTRICH, V.; SOUZA, A.P. Microsatellite markers isolated from polyploid *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.(Clusiaceae) from an enriched genomic library. *Conservation genetics*, 10(5), 1533. 2009.

CADDAH, M.K.; CAMPOS, T.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P.; BITTRICH, V.; AMARAL, M.D.C.E. Species boundaries inferred from microsatellite markers in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) and evidence of asymmetric hybridization. *Plant systematics and evolution*, 299(4), 731-741. 2013.

CALGARO, H.F.; BUZETTI, S.; SILVA, L.R.; STEFANINI, L.; MIRANDA, L.P.M.; MORAES, M.A.; MORAES, M.L.T. Distribuição natural de espécies arbóreas em áreas com diferentes níveis de antropização e relação com os atributos químicos do solo. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v. 39, n. 2, p. 233-243, 2015.

CANUTO, D.S.O.; SILVA, A.M.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M., MORAES, M.L.T. Genetic Variability in *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) Engl. Progeny Tests. *Journal of Forestry*, 7, 1-10. 2017.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Embrapa Florestas, Colombo, Brazil. 2006.

CASTRO, H.G.; SILVA, D.J.H.; OLIVEIRA, L.O.; FERREIRA, F.A.; SAKIYAMA, N.S.; BARBOSA, L.C.A.; JÚNIOR, J.I.R. Diversidade genética entre acessos de mentrasto avaliados por características botânico-agronômicas, moleculares e fitoquímicas. *Revista Ceres*, v.51, p.227-241, 2004.

CAVALLARI, M.M.; BILLOT, C.; BOUVET, J.M.; FAVREAU, B.; ZUCCHI, M.I.; PALMIERI, D.A.; GIMENES, M.A. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Casearia sylvestris* Sw.(Salicaceae), a neotropical medicinal tree. *Molecular ecology resources*, 8(4), 802-804. 2008.

CESÁRIO, L.F.; GAGLIANONE, M.C. Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. *Acta Botanica Brasilica* 22: 828-833. 2008.

CIAMPI, A.Y.; AZEVEDO, V.C.R.; GAIOTTO, F.A.; RAMOS, A.C.S.; LOVATO, M.B. Isolation and characterization of microsatellite locos for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. *Molecular ecology resources*, 8(5), 1074-1077. 2008.

CIAMPI, A.Y.; BRONDANI, R.P.V.; GRATAPAGLIA, D. Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba) Leguminosae –

Caesalpinoideae e otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, **Boletim de Pesquisa**, 16:1-40. 2000.

CNCFlora. *Astronium fraxinifolium* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Astronium fraxinifolium](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Astronium%20fraxinifolium)>. Acesso em 23 junho 2021.

CRUZ, M.V.; RODRIGUES, J.G.; SOUZA, H.A.; LOVATO, M.B. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Plathymenia reticulata* (Fabaceae). **American journal of botany**, 99(5), e210-e212. 2012.

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity** 83: 748-756. 1999.

COSTA, B.F.; RODRIGUES, L.A.; RUAS, E.A.; SOUZA, L.B.; RUAS, C.F.; VIEIRA, B.G.; CONSIN, A.R.; RUAS, P.M. Characterization of nine microsatellite locos for the tree species *Parapiptadenia rigida* (Fabaceae-Mimosoideae) and their transferability. **Genetics and Molecular Research**, 11(3), 2338-2342. 2012.

COTA, L.G.; MOREIRA, P.A.; MENEZES, E.V.; GOMES, A.S.; ERICSSON, A.R.O.; OLIVEIRA, D.A.; MELO-JR, A.F. Transferability and characterization of simple sequence repeat markers from *Anacardium occidentale* to *A. humile* (Anacardiaceae). **Genetics and Molecular Research**, 11(4), 4609-4616. 2012.

CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; BENCHIMOL, L.L.; CHIAVEGATO, M.B.; DIAS, L.A.S.; COLOMBO, C.A. Genetic diversity in common bean accessions evaluated by means of morpho-agronomical and RAPD data. **Scientia Agricola**, v.64, p.256-262, 2007.

CRISPIM, B.D.A.; DÉO, T.G.; FERNANDES, J.D.S.; VASCONCELOS, A.A.; VIEIRA, M.D.C.; CARNEVALI, T.D.O.; BAJAY, M.M.; ZUCCHI, M.I.; BARUFATTI, A. Development and characterization of microsatellite markers in *Campomanesia adamantium*, a native plant of the Cerrado ecoregions of South America. **Applications in plant sciences**, 7(9), e11287. 2019.

DANTAS, L.G.; ALENCAR, L.; HUETTEL, B.; PEDROSA-HARAND, A. Development of ten microsatellite markers for *Alibertia edulis* (Rubiaceae), a Brazilian savanna tree species. **Molecular biology reports**, 46(4), 4593-4597. 2019.

DINIZ-FILHO, J.A.F.; BINI, L.M.; RANGEL, T.F.; MORALES-CASTILLA, I.; OLALLA-TÁRRAGA, M.Á.; RODRÍGUEZ, M.Á.; HAWKINS, B.A. On the selection of phylogenetic eigenvectors for ecological analyses. **Ecography**, 35(3), 239-249. 2012.

DINIZ-FILHO, J.A.F., NABOUT, J.C., TELLES, M.P.D.C., SOARES, T.N., RANGEL, T.F.L. A review of techniques for spatial modeling in geographical, conservation and landscape genetics. **Genetics and molecular Biology**, 32(2), 203-211. 2009.

DINIZ-FILHO, J.A.F.; TELLES, M.P.C. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation biology**, 16(4), 924-935. 2002.

- DINIZ-FILHO, J.A.F.; TELLES, M. P.C.; BONATTO, S.L., EIZIRIK, E., FREITAS, T.R.O.; MARCO, J.R, SOARES, T.N. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. **Journal of Biogeography**, 35(5), 753-763. 2008.
- ECKERT, C.G.; KALISZ, S., GEBER, M.A.; SARGENT, R.; ELLE, E.; CHEPTOU, P.O.; GOODWILLIE, C.; JOHNSTON, M.O.; KELLY, J.K.; MOELLER, D.A.; PORCHER, E.; REE, R.H.; VALLEJO-MARÍN, M.; WINN, A.A. Plant mating systems in a changing world. **Trends in Ecology & Evolution**, 25(1), 35-43. 2010.
- ELLEGREN, H. Microsatellite mutations in the germline: Implications for evolutionary inference. **Trends in Genetics** 16: 551–558. 2000.
- ESSELINK, G.D.; NYBOM, H.; VOSMAN, B. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (Microsatellite DNA Allele Counting-Peak Ratios) method. **Theoretical and Applied Genetics** 109: 402–408. 2004.
- FERES, J.M.; MARTINEZ, M.L.; MARTINEZ, C.A.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. **Molecular ecology resources**, 9(1), 434-437. 2009.
- FERES, J.M.; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* (Leguminosae), a neotropical tree species. **American journal of botany**, 99(4), e154-e156. 2012.
- FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA, P.R.; OLIVEIRA-SANTOS, M.; MAYOR, M.S.; MESTRINER, M.A.; SOUZA, A.P.; ALZATE-MARIN, A.L. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics**, 9(5), 1281-1285. 2008.
- FRANKEL, O.H. Natural variation and its conservation. In: **Genetic diversity in plants**. Springer, Boston, MA, p. 21-44. 1977.
- GAIOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm–*Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart.(Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, 1(1-2), 86-88. 2001.
- GAO, C.; REN, X.; MASON, A.S.; LI, J.; WANG, W.; XIAOMAND, F.U.D. Revisiting an important component of plant genomes: microsatellites. **Funct Plant biol** 40:645. 2013.
- GLASENAPP, J.S.; CASALI, V.W.D.; MARTINS, E.R.; CRUZ-BARBOSA, P.B. Descrição da diversidade genética de populações naturais de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) coville em unidades de conservação de Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, v.38, n.1, p.103-112, 2014.
- GROHME, M.A.; SOLER, R.F.; WINK, M.; FROHME, M. Microsatellite marker discovery using single molecule real-time circular consensus sequencing on the Pacific Biosciences RS. **BioTechniques**, 55, 253–256. 2013.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F.; PETIT, R.J. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources** 11: 591–611. 2011.

GUIDUGLI, M.C., ACCORONI, K.A.G., MESTRINER, M.A., CONTEL, E.P.B., MARTINEZ, C.A., ALZATE-MARIN, A.L. Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). **Genetics and molecular biology**, 33(1), 131-134. 2010.

GUIDUGLI, M.C., FERREIRA-RAMOS, R., SOUSA, A.C.B., CIDADE, F.W., MARCONI, T.G., MESTRINER, M.A., GROppo, M., ALZATE-MARIN, A.L. Genetic diversity of *Metrodorea nigra* (Rutaceae) from a small forest remnant in Brazil assessed with microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, 11(1), 10-16. 2012.

GUIMARÃES, R.A., TELLES, M.P.C., ANTUNES, A.M., CORRÊA, K.M., RIBEIRO, C.V.G., COELHO, A.S.G., SOARES, T. N. Discovery and characterization of new microsatellite loci in *Dipteryx alata* vogel (Fabaceae) using next-generation sequencing data. **Genetics and Molecular Research**, 16(2). 2017.

HEDRICK, P.W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology & Evolution**, 16(11), 629-636. 2001.

HODEL, R.G.J.; SEGOVIA-SALCEDO, M.C.; LANDIS, J.B.; CROWL, A.A.; SUN, M.; LIU, X.; GITZENDANNER, M.A.; DOUGLAS, N.A.; GERMAIN-AUBREY, C.C.; CHEN, S.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. **Applications in Plant Sciences** 4: 1600025. 2016a.

HODEL, R.G.J.; GITZENDANNER, M.A.; GERMAIN-AUBREY, C.C.; LIU, X.; CROWL, A.A.; SUN, M.; LANDIS, J.B.; SEGOVIA-SALCEDO, M.C.; DOUGLAS, N.A.; CHEN, S.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Data from: A new resource for the development of SSR markers: Millions of locos from a thousand plant transcriptomes. **Dryad Digital Repository**. 2016b.

IBAMA (1992) **Portaria Ibama** nº 37-N, de 03 de abril de 1992 – Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008034139.pdf> Acesso em: 26 de nov. 2019.

JENNINGS, T.N.; KNAUS, B.J.; MULLINS, T.D.; HAIG, S.M.; CRONN, R.C. Multiplexed microsatellite recovery using massively parallel sequencing. **Molecular Ecology Resources** 11: 1060–1067. 2011.

JENRICH, H. **Vegetação arbórea e arbústea nos altiplanos das chapadas do Piauí central**. Teresina: Ministério do Interior-DNOCS/Covênio Brasil-Alemanha, 1989. 90 p

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. **Euphytica** 177: 309–334. 2011.

KASHI, Y.; KING, D. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. **Trends Genet** 22:253-259. 2006.

- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conserv. Biol.** 19(3):707-713. 2005.
- LACERDA, A.E.B.; KANASHIRO, M.; SEBBENN, A.M. Effects of Reduced Impact Logging on genetic diversity and spatial genetic structure of a *Hymenaea courbaril* population in the Brazilian Amazon Forest. **For. Ecol. Manage.** 255, 1034–1043, 2008.
- LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES A.; NEVO, E. Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. **Molecular Ecology** 11: 2453–2465. 2002.
- LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Mol Biol Evol** 21:991-1007. 2004.
- LEITE, E.J. State-of-knowledge on *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics** Vol. 5/1, pp. 63–77. 2002.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v.2, 352p.
- LOWE, A.J.; BOSCHER, D.; WARD, M.; BACLES, C.F.E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, 95(4), 255. 2005.
- MANOEL, R. O.; ROSSINI, B. C.; CORNACINI, M. R.; MORAES, M. L., CAMBUIM, J.; ALCÂNTARA, M. A.; SILVA, A.M.; SEBBENN, A. M.; MARINO, C. L. Landscape barriers to pollen and seed flow in the dioecious tropical tree *Astronium fraxinifolium* in Brazilian savannah. **PloS one**, 16(8), e0255275. 2021.
- 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**, v.64, n.3, p.108-116, 2015.
- MARÍN, W.A.; FLORES, E.M. *Astronium graveolens* Jacq. Pages 311-314 in VOZZO, J. A. **Tropical Tree - Seed Manual**. United States Department of Agriculture - Forest Service. 2002.
- MASON, A.S. SSR genotyping. In: **Plant genotyping** (pp. 77-89). Humana Press, New York, NY. 2015.
- MAUÉS, M.M; OLIVEIRA, P.E.A.M. Consequências da fragmentação do habitat na ecologia reprodutiva de espécies arbóreas em florestas tropicais, com ênfase na Amazônia. **Oecologia Australis** v. 14(1): p. 238-250. 2010.
- MENEZES, E.V.; SOUTO, W.F.; CIAMPI, A.Y.; AZEVEDO, V.C.; VALÉRIO, H.M.; PIMENTA, M.A. Development and characterization of DNA microsatellite *primers* for buriti (*Mauritia flexuosa* Lf). **Genet Mol Res**, 11(4), 4058-4062. 2012.
- MENGISTU, F.G.; MOTOIKE, S.Y.; CAIXETA, E.T.; CRUZ, C.D.; KUKI, K.N. Cross-species amplification and characterization of new microsatellite markers for the macaw palm, *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Plant Genetic Resources**, 14(3), 163-172. 2016.

- MISSIO, R.F.; LINS, V.S.; BALERONI, C.R.S.; ANTON, C. S.; SILVA, A.M.; CAMBUIM, J.; MORAES, M.L.T. Ocorrência de *Astronium fraxinifolium* em associação com outras espécies na ocupação de áreas degradadas em Selvíria-MS. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE ÁREAS DEGRADADAS: água e biodiversidade - trabalhos voluntários, 5, 2002, Viçosa. **Anais...** Viçosa : Folha de Viçosa, 2002. p. 425-427.
- MOREIRA, P.A.; SOUSA, S.A.; OLIVEIRA, F.A.; ARAÚJO, N.H.; FERNANDES, G.W.; OLIVEIRA, D.A. Characterization of nine transferred SSR markers in the tropical tree species *Enterolobium contortisiliquum* (Fabaceae). **Genet. Mol. Res.** 11, 3729-3734. 2012.
- MORI, E.S.; SEBBENN, A.M.; TAMBARUSSI, E.V.; GURIES, R.P. Sistema de reprodução em populações naturais de *Peltophorum dubium*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.41, n.99, p.307-317, 2013.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, Washington, v. 403, p. 853–858. 2000.
- NARUM, S.R.; BUERKLE, C.A.; DAVEY, J.W.; MILLER, M.R.; HOHENLOHE, P.A. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. **Molecular Ecology** 22: 2841–2847. 2013.
- NEIVA, D.S.; MELO JÚNIOR, A.F.; OLIVEIRA, D.A.; ROYO, V.A.; BRANDÃO, M.M.; MENEZES, E.V. *Acrocomia emensis* (Arecaceae) genetic structure and diversity using SSR molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, 15(1), 1-11. 2016.
- NEVO, E. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. **Proc Natl Acad SciUSA** 98:6233-6240. 2001.
- NETO, S.P.M. **Árvores nativas do cerrado com potencial madeireiro**. 2008. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/>>. Acesso em: 31 jan. 2019.
- NUCCI, S.M.; AZEVEDO-FILHO, J.A.; COLOMBO, C.A.; PRIOLLI, R.H.G.; COELHO, R.M.; MATA, T.L.; ZUCCHI, M.I. Development and characterization of microsatellites markers from the macaw. **Mol. Ecol. Resour.** 8: 224-226. 2008.
- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29, 294-307. 2006.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T.; RATTER, J.A. Vegetation physiognomies and wood flora of the bioma Cerrado. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Eds.). **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical Savanna**. New York: Columbia University Press, p. 91-120. 2002.
- OLIVEIRA, F.A.; TARAIZI, R.; MENEZES, I.P.; VAN DEN BERG, C.; TSAI, S.M.; GAIOTTO, F.A. Microsatellite markers for *Plathymentia reticulata* (Leguminosae). **American journal of botany**, 99(10), e391-e393. 2012.
- OTSUBO, H.C.B.; MORAES, M.L.T.; MORAES, M.A.; JOSÉ NETO, M.; FREITAS, M.L.M.; COSTA, R.B.; RESENDE, M.D.V.; SEBBENN, A.M. Variação genética para

caracteres silviculturais em três espécies arbóreas da região do bolsão sul-mato-grossense. **Cerne**, Lavras, v. 21 n. 4, p. 535-544. 2015.

PELL, S.K.; MITCHELL, J.D.; MILLER, A.J.; LOBOVA, T.A. Anacardiaceae. In K. KUBITZKI (ed.) **The families and genera of vascular plants** × Flowering plants: Eudicots. Sapindales, Curcubitales, Myrtales. Berlin: Springer, p. 7-50, 2011.

PELL, S.K. **Molecular systematics of the cashew Family (Anacardiaceae)**. Ph.D. dissertation. Baton Rouge: Louisiana State University. 2004.

PEREIRA, M.F.; BANDEIRA, L.F.; BLANCO, A.J.V.; CIAMPI, A.Y.; COELHO, A.S.G. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species. **Molecular ecology resources**, 8(6), 1329-1331. 2008.

PÉREZ-JIMÉNEZ, M.; BESNARD, G.; DORADO, G.; HERNANDEZ, P. Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. **PLoS One** 8:e70507. 2013.

PHUMICHA, C.; PHUMICHA, T.; WONGKAEW, A. Novel chloroplast microsatellite (cpSSR) markers for genetic diversity assessment of cultivated and wild *Hevea* rubber. **Plant Mol Biol Report** 33:1486-1498. 2015.

RANDRIANASOLO, A. **Systematics and evolution of three Malagasy genera of Anacardiaceae: Micronychia Oliv., Protorhus Engl. and Rhus section Baronie (Baker) H. Perrier**. (PhD dissertation) University of Missouri at St. Louis, USA. 1998.

REYS, P.; GALETTI, M.; MORELLATO, P.C.L.; SABINO, J. Fenologia reprodutiva e disponibilidade de frutos de espécies arbóreas em mata ciliar no rio Formoso, Mato Grosso do Sul. **Biota Neotropical**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 309-318, 2005.

RIBEIRO, P.C.C.; CARVALHO-MULLER, L.A.; LEMOS-FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. Transferability and characterization of nuclear microsatellite markers in populations of *Annona coriacea* (Annonaceae), a tree from the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Botany**, 37(3), 353-356. 2014.

RIVA, L.C. **Crescimento, adaptação e qualidade da madeira em progênies de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* procedentes de áreas antropizadas**. 2020. 89f. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2020.

RITTER, L.M.O.; BAJAY, M.M.; MONTEIRO, M.; SOUZA, R.G.; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, P.Y. Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), a typical species of the Brazilian cerrado. **American journal of botany**, 99(3), e97-e98. 2012.

RODRIGUES, A.J.L.; YAMAGUISHI, A.T.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; LIMA, J.D.S.; TELLES, M.P.D.C. Development of microsatellite markers for *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 3, p. 7274-7278, July 2015.

RUAS, E.A.; CONSON, A.R.O.; COSTA, B.F.; DAMASCENO, J.O.; RODRIGUES, L.A.; RECK, M.; VIERIA, A.O.S.; RUAS, P.M.; RUAS, C. F. Isolation and characterization of ten microsatellite locos for the tree species *Luehea divaricata*

Mart.(Malvaceae) and intergeneric transferability. **Conservation Genetics Resources**, 1(1), 245. 2009.

SANTIN, D.A. Revisão taxonômica do gênero *Astronium* Jacq. e revalidação do gênero *Myracrodruon* Fr. Allem. (Anacardiaceae). **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1989.

SANTOS, R.M.; VIEIRA, F.A.; FAGUNDES, M.; NUNES, Y.R.F.; GUSMÃO, E. Riqueza e similaridade florística de oito remanescentes florestais no norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 135-144, 2007.

SANT'ANA, V.Z. **Proporção sexual em populações de Myracrodruon urundeuva para fins de formação de pomares de sementes por mudas**. 2017. 64p. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2017.

SAUL, F.A.C. **Progênes de Myracrodruon urundeuva fr. All. Em diferentes sistemas de plantio para fins de conservação genética ex situ**. 2020. 74f. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2020.

SEBBENN, A.M.; VILAS BÔAS, O. Conservação *ex situ* de angico *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speng., em Assis, Estado de São Paulo. In: VILAS BÔAS, O; DURIGAN, G. **Pesquisas em conservação e recuperação ambiental no Oeste Paulista**. São Paulo: Instituto Florestal, 2004. p.484

SEBBENN, A.M.; DEGEN, B.; AZEVEDO, V.C.R.; SILVA, M.; LACERDA, A.B.; CIAMPI, A.Y.; KANASHIRO, M.; CARNEIRO, F.S.; TOMPSON, I.; LOVELESS, M.D. Modelling the long-term impact of selective logging on genetic diversity and demographic structure of four tropical tree species in the Amazon forest. **For. Ecol. Manage.** 254, 335–349, 2008.

SEBBENN, A.M.; FREITAS, M.L.M.; ZANATTO, A.C.S.; MORAES, E. Seleção dentro de progênes de polinização aberta de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze (Lecythidaceae), visando à produção de sementes para recuperação ambiental. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 27-37, 2009.

SEMA-PA. Extração e Movimento de Toras de Madeira Nativa. Período de 1/1/2006 até 23/10/2016. **Dados**, Belém, PA, 2021.

SEMA. **SISFLORA. 2011**. Disponível em: <<http://www.sema.mt.gov.br/portalsisflora>>. Acesso em: 10 jul. 2021.

SILVA, J.R.; SANTOS, W.D.; MORAES, M.L.T.; SHIMIZU, J.Y.; SOUSA, V.A.; AGUIAR, A.V. Seleção de procedências e progênes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze para produção de madeira e pinhão. **Sci. For.**, Piracicaba, v. 46, n. 120, p. 519-531, dez. 2018.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. Anacardiaceae. In R.C FORZZA et al (org) **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.1, p. 599-602. 2010.

- SOARES, T.N.; MELO, D.B.; RESENDE, L.V.; VIANELLO, R.P.; CHAVES, L.J.; COLLEVATTI, R.G.; TELLES, M.P.D.C. Development of microsatellite markers for the neotropical tree species *Dipteryx alata* (Fabaceae). **American journal of botany**, 99(2), e72-e73. 2012.
- SOUZA, D.C.L.; ROSSINI, B.C.; DE SOUZA, F.B.; SEBBENN, A.M.; MARINO, C.L.; MORAES, M.L.T. Development of microsatellite markers for *Myracrodruon urundeuva* (FF & MF Allemão), a highly endangered species from tropical forest based on next-generation sequencing. **Molecular biology reports**, 45(1), 71-75. 2018.
- SOUZA, H.A.; COLLEVATTI, R.G.; LEMOS-FILHO, J.P.; SANTOS, F.R.; LOVATO, M.B. Development of microsatellite markers for *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a widespread tree from the Brazilian Cerrado. **American journal of botany**, 99(3), e102-e104. 2012.
- TAHERI, S.; LEE ABDULLAH, T.; YUSOP, M.R.; HANAFI, M.M.; SAHEBI, M.; AZIZI, P.; SHAMSHIRI, R.R. Mining and development of novel SSR markers using next generation sequencing (NGS) data in plants. **Molecules**, 23(2), 399. 2018.
- TELLES, M.P.D.C.; SILVA, J.B.; RESENDE, L.V.; VIANELLO, R.P.; CHAVES, L.J.; SOARES, T.N.; COLLEVATTI, R.G. Development and characterization of new microsatellites for *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). **Genet. Mol. Res.**, 12, pp.3124-3127, 2013.
- VENCOVSKY, R.; CHAVES, L.J.; CROSSA, J. Variance effective population size for dioecious species. **Crop Science**, Madison, v.52, n.1, p.79-90, 2012.
- VIEIRA, M.L.C.; SANTINI, L.; DINIZ, A.L.; FREITAS, C.M. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, 39, 3, 312-328. 2016.
- VIVAS, C.V.; Van Den BERG, C.; QUEIROZ, L.P.; GAIOTTO, F.A. Development of microsatellite markers in *Moldenhawera blanchetiana* and their transferability to *M. luschnathiana* (Fabaceae). **Conservation genetics resources**, 7(1), 255-257. 2015.
- VRANCKX, G.; JACQUEMYN, H.; MUYS, B.; HONNAY, O. et al. Meta-analysis of susceptibility of woody plants to loss of genetic diversity through habitat fragmentation. **Conservation Biology**, Cambridge, v.26, p.228-237, 2012.
- WEI, N.A.; BEMMELS, J.B.; DICK, C.W. The effects of read length, quality and quantity on microsatellite discovery and primer development: From Illumina to PacBio. **Molecular Ecology Resources** 14: 953-965. 2014.
- ZALAPA, J.E.; CUEVAS, H.; ZHU, H.; STEFFAN, S.; SENALIK, D.; ZELDIN, E.; MCCOWN, B.; HARBUT, R.; SIMON, P. Using nextgeneration sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) locos in the plant sciences. **Am J Bot** 99:193-208. 2012.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: A review. **Molecular Ecology** 11: 1-16. 2002.
- ZARGAR, S.M.; RAATZ, B.; SONAH, H.; BHAT, J.A.; DAR, Z.A.; AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R. Recent advances in molecular marker techniques: Insight into QTL

mapping, GWAS and genomic selection in plants. **J. Crop Sci. Biotechnol.** 18, 293–308. 2015.

ZULIAN, D.F.; CAMBUIM, J.; SAUL, F.A.C.; RIVA, L.C.; ALVES, P.F.; MORAES, M.A.; CORNACINI, M.R.; MARINO, C.L.; ROSSINI, B.C.; MORAES, M.L.T. Produção de sementes melhoradas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Alemão). In: Evangelista, W.V. **Produtos Florestais Não Madeireiros: tecnologia, mercado, pesquisas e atualidades**. Guarujá, SP: Científica Digital [livro eletrônico]. 2021.

4. CAPÍTULO 1

FLORESCIMENTO DE *Astronium fraxinifolium* SCHOTT (ANACARDIACEAE) EM TESTE DE PROCEDÊNCIAS E PROGÊNIES

RESUMO

A proporção desbalanceada de sexos em espécies dioicas implica contribuição desigual do número de gametas, reduzindo o tamanho efetivo populacional e afetando a conservação genética da espécie. Nesse sentido, realizou-se a identificação sexual de indivíduos de gonçalo-alves – *Astronium fraxinifolium* – localizados na Fazenda de Ensino e Pesquisa da FEIS/UNESP, em Selvíria-MS, em teste de procedências e progênies instalado em 1996, com delineamento experimental de blocos completos casualizados, com 30 tratamentos (famílias) de Mato Grosso do Sul (MS) e 30 de São Paulo (SP), 5 repetições e 10 plantas por parcela, no espaçamento de 3 m × 1,5 m, em plantio alternado com jacarandá - *Jacaranda cuspidifolia*. A identificação sexual das árvores ocorreu em cinco eventos reprodutivos com base na visualização das flores femininas e masculinas. Nos anos de 2014, 2017, 2018, 2019 e 2020 foram observadas flores em 130, 186, 335, 283 e 256 indivíduos de SP, respectivamente, e em 194, 331, 542, 422 e 439 indivíduos de MS, respectivamente. Em todos os eventos a procedência de MS teve uma porcentagem maior de florescimento (16%, 28%, 47%, 37% e 38%) que SP (11%, 17%, 31%, 32% e 32%). A razão sexual foi tendenciosa para as flores masculinas (0,28, 0,33, 0,46, 0,47 e 0,40 para MS e 0,28, 0,37, 0,42, 0,45 e 0,37 para SP), porém nos anos de 2018 e 2019 não diferiram significativamente da proporção 1:1. Em todos os eventos reprodutivos o tamanho efetivo populacional (N_e') foi maior conforme o aumento de indivíduos que floresceram em combinação com uma proporção sexual próxima de 1:1 ($N_e' = 76, 146, 305, 225, 227$ para MS e $N_e' = 46, 82, 168, 142, 118$ para SP). Um manejo no teste, considerando a proporção sexual, é recomendado para evitar cruzamentos biparentais e manter a diversidade genética nas próximas gerações. Precipitação e temperatura são fatores importantes para fenologia de espécies arbóreas que ocorrem no Cerrado, nesse sentido, é necessário que investigações continuem para compreender melhor o florescimetno e a biologia reprodutiva da espécie em conservações *ex situ*.

Palavras-chaves: conservação genética, cerrado, biologia reprodutiva, dioica, espécie nativa.

4.1 INTRODUÇÃO

O sistema de reprodução se refere à forma como as espécies recombina seus genes a cada evento reprodutivo e formam as populações descendentes. Neste sentido, conhecer sobre o florescimento da espécie é fundamental para estabelecer estratégias para a conservação genética e recuperação ambiental, principalmente no caso de plantas dioicas, em que a proporção desbalanceada de sexos implica contribuição desigual do número de gametas, o que reduz o tamanho efetivo populacional e afeta diretamente na sua conservação genética (VENCOVSKY et al., 2012).

O sistema sexual conhecido por dioicia é caracterizado pela presença de indivíduos produtores de flores exclusivamente estaminadas ou pistiladas (FREEMAN et al. 1997; TANURDZIC; BANKS, 2004). Os principais fatores responsáveis por essa evolução são a redução de endogamia, especialização sexual e seleção disruptiva (BAWA, 1980, FREEMAN et al., 1997). Em comunidades de cerrado, a frequência de espécies lenhosas dioicas (aproximadamente 15% das espécies) é maior que na flora de angiospermas como um todo (6% das espécies). Além disso, foi constatado que as plantas de Cerrado dependem da reprodução sexuada para sua regeneração e dispersão. Entre as espécies lenhosas, a reprodução sexuada é mediada obrigatoriamente por vetores bióticos, sendo a maioria delas autoincompatíveis ou dioicas (OLIVEIRA, 1996; OLIVEIRA; GIBBS, 2000).

A família Anacardiaceae é predominantemente representada por espécies dioicas (BULLOCK, 1985; IBARRA-MANRÍQUEZ; OYAMA, 1992; RENNER; RICKLEFS, 1995) e de ocorrência principalmente em regiões tropicais e subtropicais (HEYWOOD 1985). *Astronium fraxinifolium* Schott, também conhecido como gonçalo-alves, pertence a essa família. A espécie é uma planta decídua, heliófita, pioneira, seletiva xerófila e dioica. Floresce durante os meses de agosto e setembro, com a planta despida de sua folhagem (LORENZI, 1998). A polinização é entomófila (ALLEM, 1991) e a frutificação ocorre entre outubro e novembro, sendo a dispersão anemocórica (REYS et al., 2005).

Astronium fraxinifolium é muito explorada devido à qualidade da sua madeira (LORENZI, 1998; NETO, 2008). A espécie tem ocorrência no cerrado e já foi indicada como ameaçada de extinção na categoria vulnerável. Em alguns locais sua exploração é permitida apenas sobre plano de manejo autorizado, acompanhado de estudo prévio de avaliação de impacto ambiental. Segundo Santos et al., (2007) há poucos indivíduos de *A. fraxinifolium* em remanescentes de florestas estacionais decíduas no domínio do

cerrado. Além disso, a espécie carece de dados, o que exige estudos detalhados sobre a espécie (LEITE, 2002; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2011). Neste sentido, a fim de contribuir com informações acerca da espécie, o trabalho verificou o florescimento de *A. fraxinifolium* em um teste de procedências e progênies na região Leste do Mato Grosso do Sul e seu tamanho efetivo em cinco eventos reprodutivos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

A identificação do florescimento foi realizada em um teste de procedências e progênies conduzido em condições de campo na Fazenda de Ensino e Pesquisa da FEIS/Unesp, situada à margem direita do rio Paraná, no município de Selvíria-MS, a qual está localizada nas coordenadas geográficas 20°20'08,64"S, 051°24'16,04"W e 378 metros de altitude (Figura 1). O teste é composto por sementes de 60 matrizes de *A. fraxinifolium* de duas procedências. As árvores matrizes de uma procedência estão localizadas às margens da rodovia do município de Ilha Solteira-SP. As da outra procedência estão localizados às margens da rodovia do município de Selvíria-MS. As populações estão separadas por uma barreira geográfica, o rio Paraná (Figura 2). Os blocos são completos casualizados, com 60 tratamentos (progênies) e 5 repetições. As parcelas do experimento estão em disposição linear, com 10 plantas por parcela, no espaçamento de 3 m × 1,5 m, em plantio alternado com *Jacaranda cuspidifolia*.

Figura 1. Imagem via satélite do teste de procedências e progênes de *Astronium fraxinifolium* em Selvíria-MS.



Fonte: Imagem digital 2021, dados cartográficos 2021 Google, Inav/Geosistemas SRL.

Figura 2. Imagem aérea da área de coleta das árvores matrizes de *Astronium fraxinifolium*, localizadas em Selvíria – Mato Grosso do Sul e Ilha Solteira – São Paulo.



Fonte: Imagem digital 2021, dados cartográficos 2021 Google, Inav/Geosistemas SRL.

O tipo climático, segundo KÖEPPEN, é AW, caracterizado como tropical úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno, estando a umidade relativa dos meses mais chuvosos entre 60 e 80%. A vegetação original encontrada na área em estudo é do tipo cerrado. O solo local é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico, típico argiloso, a moderado, hipidistrófico, álico, caulínítico, férrico, compactado, muito profundo, moderadamente ácido (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA, 2018).

4.2.2 Métodos

A identificação do florescimento e determinação do sexo foi realizada por observação visual de cada árvore. O teste de procedências e progênies foi monitorado para estabelecer as datas de início de florescimento em cada evento reprodutivo. A identificação ocorreu em duas etapas, a primeira consistindo na identificação de árvores com flores, e para isso, no início do florescimento o experimento foi percorrido e todas as árvores que apresentavam flores foram marcadas (Figura 3). Após uma semana, outra observação foi realizada para identificar novos indivíduos com flores. A segunda etapa foi realizada um mês após a primeira etapa e nesse momento todas as árvores que apresentavam frutos foram marcadas e novas árvores com flores também. Após alguns dias o experimento foi percorrido mais uma vez, para identificar e marcar mais árvores que viessem a apresentar frutos. A identificação de florescimento e determinação sexual foi realizada em cinco eventos reprodutivos, no ano de 2014 (CORNACINI et al., 2017), 2017, 2018, 2019 e 2020 (Figura 4).

Figura 3. Teste de procedências e progênies de *Astronium fraxinifolium* com árvores florescendo em Selvíria-MS.



Fonte: Própria autora

Figura 4. Identificação do florescimento e sexo de árvores de *Astronium fraxinifolium* em Selvíria-MS. **A** – marcação das árvores. **B** – árvore com flores masculinas. **C** – árvore com frutos.



Fonte: Própria autora

Para verificar a relação de 50% de árvores femininas para 50% de árvores masculinas, foi realizado o teste estatístico de Qui-quadrado (χ^2) entre o florescimento esperado e o observado.

O tamanho efetivo populacional (N_e) foi estimado com base no método descrito por Vencovsky et al. (2012) para espécies dioicas. Esse parâmetro foi estimado para todos os eventos reprodutivos. Assim, o tamanho efetivo foi estimado conforme a expressão:

$$N_e \approx 4t/D_4$$

$$D_4 = \frac{1}{r(1-r)} \left(\frac{N_f}{2N_f-1} + \frac{N_m}{2N_m-1} \right) + \frac{N_f}{2N_f-1} \frac{2}{F} [(1-v)t-1] + \frac{N_m}{2N_m-1} \frac{2}{M} [(1-v)t-1]$$

Onde:

$$\hat{t} = F + M;$$

$$\hat{r} = \frac{F}{F+M};$$

$$u = \frac{F}{N_f} (0 < u \leq 1);$$

$$v = \frac{M}{N_m} (0 < v \leq 1)$$

em que:

$\hat{t}$: número total de indivíduos (sexo feminino e masculino) que contribuem para o evento reprodutivo; $\hat{r}$: proporção sexual; N_f e N_m : número de pais da população de referência do sexo feminino e masculino (esperado), respectivamente; F e M : número total de pais do sexo feminino e masculino (observado), respectivamente, que participaram do evento reprodutivo; u e v = fração de pais funcionais do sexo feminino e masculino, respectivamente, da população de referência.

Para um cálculo mais preciso o tamanho efetivo populacional foi corrigido conforme a seguinte expressão:

$$N'_e \approx \frac{N_e}{1+f}$$

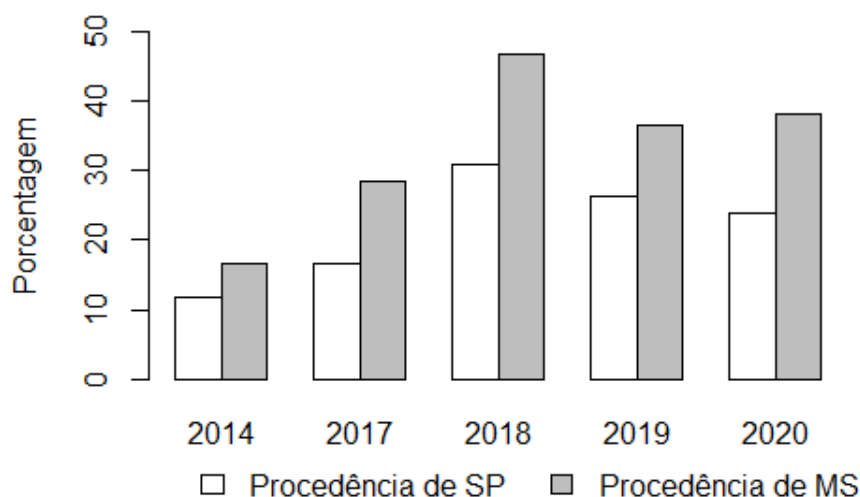
em que:

N'_e : tamanho efetivo corrigido; f : coeficiente de endogamia obtido a partir do coeficiente de coancestria (Θ) (Capítulo 3) para as populações de *A. fraxinifolium*.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O florescimento total do teste de procedências e progênies variou de 14% (2014) a 39% (2018). Em números absolutos, no ano de 2014, dos 2.278 indivíduos, 324 floresceram e, no ano de 2018, dos 2.237 indivíduos, 877 floresceram. Em todos os anos os indivíduos da procedência MS se mostraram adaptados às condições edafoclimáticas de origem e tiveram uma porcentagem maior de florescimento (16% a 46%) que SP (11% a 31%), que possivelmente estão em processo de seleção adaptativa às novas condições *ex situ* (Figura 5).

Figura 5. Florescimento de *Astronium fraxinifolium* (%) em cinco eventos reprodutivos dentro da procedência de Ilha Solteira-SP e da procedência de Selvíria-MS em teste de procedências e progênies localizado em Selvíria-MS.



Houve um aumento do florescimento nas duas procedências nos anos de 2017 e 2018, atingindo seu máximo florescimento em 2018. Nos anos de 2019 e 2020 o florescimento se manteve em torno de 30% (Figura 6). Em todos os anos, o florescimento de indivíduos com flores masculinas foi maior que com flores femininas. Com isso a proporção sexual foi predominantemente 1:1 nas duas procedências, e apenas no ano de 2019 e no ano de 2018 na procedência de MS (Tabela 1). Porém, na maioria dos anos o florescimento de indivíduos com flores masculinas foi significativamente maior que dos indivíduos com flores femininas, a predominância de indivíduos com flores masculinas também ocorreu em plantio da espécie *Myrocarodruoum urundeuva* (Anacardiaceae) (BERTONHA et al., 2016; SANT'ANA, 2017; RIVA, 2020; SAUL, 2020).

Figura 6. Florescimento de árvores de flores femininas e masculinas de *Astronium fraxinifolium* (%) em cinco eventos reprodutivos dentro da procedência de Ilha Solteira-SP e da procedência de Selvíria-MS em teste de procedências e progênes localizados em Selvíria-MS.

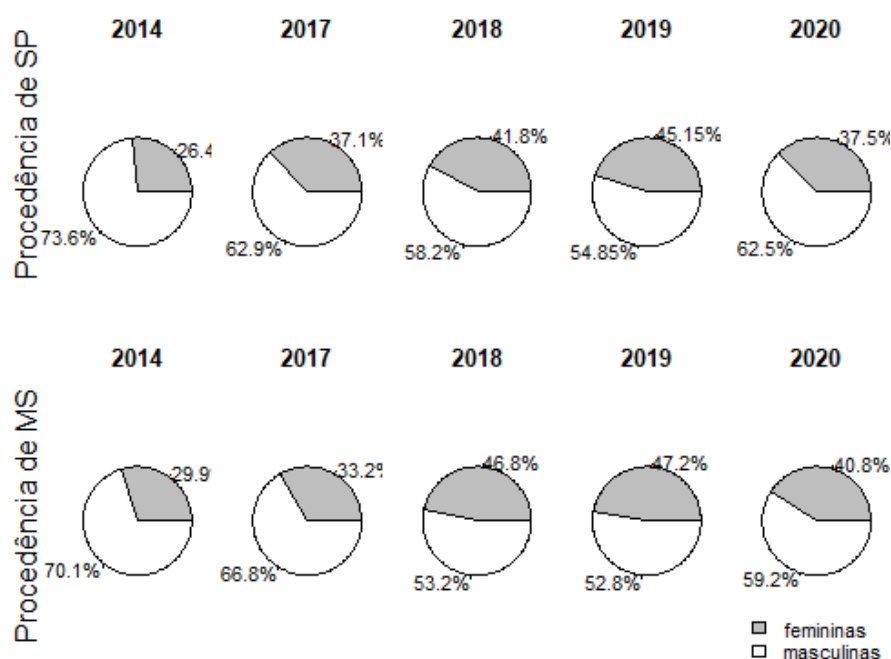


Tabela 1. Frequências observadas (FO) e esperadas (FE) para indivíduos de *Astronium fraxinifolium* para árvores de flores femininas (F) e masculinas (M) para procedência de Selvíria-MS e Ilha Solteira-SP, em Selvíria-MS.

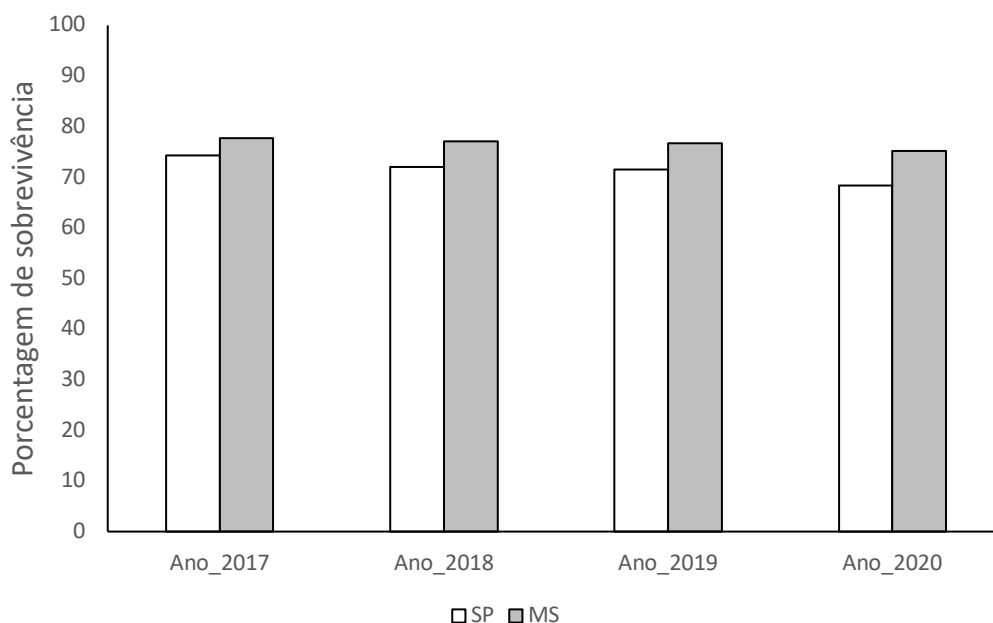
		MS			SP		
		FO	FE	χ^2	FO	FE	χ^2
2014	M	136	97	15.68**	92	62.5	13.92**
	F	58	97	15.68**	33	62.5	13.92**
	Total	194	194	31.36**	125	125	27.85**
2017	M	221	166	18.22**	117	94	5.63*
	F	111	166	18.22**	71	94	5.63*
	Total	332	332	36.45**	188	188	11.26**
2018	M	289	270.5	1.27 ^{ns}	195	167.5	4.51*
	F	252	270.5	1.27 ^{ns}	140	167.5	4.51*
	Total	541	541	2.53 ^{ns}	335	335	9.03**
2019	M	225	212	0.80 ^{ns}	156	142.5	1.28 ^{ns}
	F	199	212	0.80 ^{ns}	129	142.5	1.28 ^{ns}
	Total	424	424	1.59 ^{ns}	285	285	2.56 ^{ns}
2020	M	261	220	7.64**	159	127.5	7.78**
	F	179	220	7.64**	96	127.5	7.78**
	Total	440	440	15.28**	255	255	15.56**

** : Significativo a 1% com um grau de liberdade; * : Significativo a 5% com um grau de liberdade; ^{ns} : não significativo.

Segundo Opler e Bawa (1978), é comum que em algumas espécies florestais dioicas os indivíduos produtores de gametas masculinos floresçam antes dos femininos como ocorreu nesse período de avaliação para *A. fraxinifolium*. A proporção sexual a princípio foi predominante para o sexo masculino. Em população natural foi observada a proporção de 1:1 para *A. fraxinifolium* (ALCANTARA, 2019), assim como para diversas espécies dioicas (OPLER; BAWA, 1978; LENZA; OLIVEIRA, 2005; LENZA; OLIVEIRA, 2006; PALUDO et al., 2009; AMORIM et al., 2011).

O aumento do florescimento no decorrer dos anos pode ser sustentado por alguns fatores como uma característica da própria espécie e também a uma seleção natural dentro do plantio onde alguns indivíduos são dominados e eliminados, o que proporciona um espaço maior para as árvores permanentes e, conseqüentemente um aumento do florescimento (Figura 7).

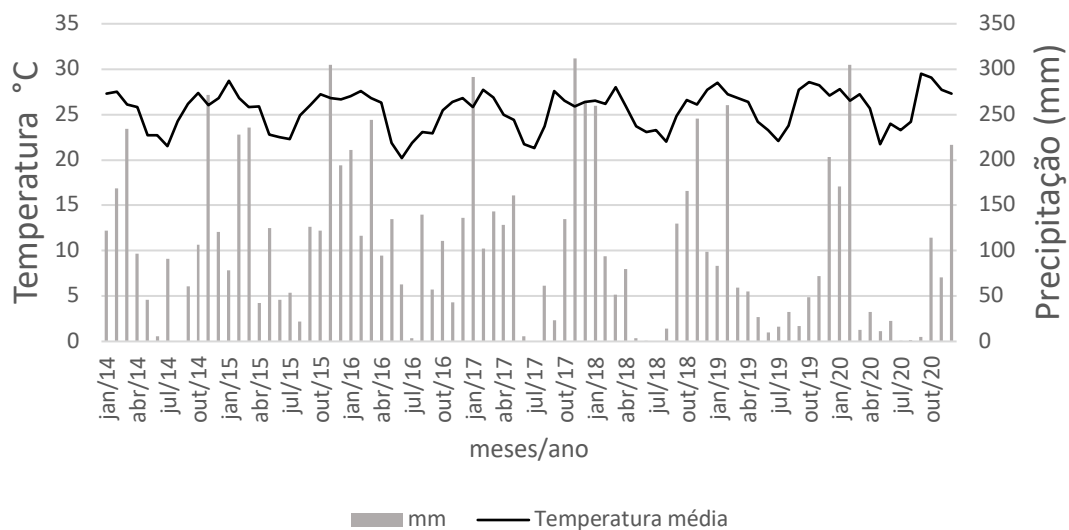
Figura 7. Sobrevivência de *Astronium fraxinifolium* em um teste de procedências progênes, aos 21, 22, 23 e 24 anos em plantio consorciado com progênes de *Jacaranda cuspidifolia*, em Selvíria-MS.



Quando se trata de florescimento de plantas, sabe-se da influência de fatores como precipitação (OPLER et al. 1976), estresse hídrico (BORCHERT, 1980, REICH; BORCHERT, 1984), irradiação (WRIGHT; VAN SCHAIK, 1994) e fotoperíodo (RIVERA; BORCHERT, 2001). Cesário e Gaglianone (2008) verificaram correlação entre a fenofase de botões e temperatura para a espécie dioica *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). A Figura 8 apresenta a precipitação média mensal e a média da temperatura para a região nos anos de 2014 a 2020. O ano de 2018 foi de seca rigorosa nos meses que antecedem o florescimento (junho e julho) se comparado aos outros anos, o que pode indicar influência na alta floração.

No geral foi observado que a espécie *A. fraxinifolium* apresentou um florescimento anual para as progênies que floresceram, o que corresponde ao estudo de Morellato (1991), que descreve a espécie *Astronium graveolens* com padrão anual de florescimento e difere de Brito Neto et al. (2018), que relatam um padrão bianual para *A. graveolens*. O padrão fenológico de muitas espécies perenes tende a acompanhar a oscilação sazonal das precipitações, principalmente quando há períodos de estiagem, como ocorre no Cerrado. Essas entram em repouso na estação seca e cumprem novo ciclo vegetativo anual no período chuvoso seguinte. Florescer sincronizadamente favorece a atração de polinizadores, facilitando o fluxo de pólen e a reprodução cruzada (MARQUIS, 1988) e é fator imprescindível para o sucesso da polinização de espécies dioicas (CESARIO; GAGLIANONE, 2008). Esse fatores são importantes para flores de curta duração, que são comuns em espécies de plantas neotropicais (CUNNINGHAM, 1994) e que são polinizadas por abelhas, como são as de *A. fraxinifolium*.

Figura 8. Média mensal de temperatura e precipitação da cidade de Ilha Solteira-SP no período de 2014 a 2020.



Fonte: Canal Clima da Unesp de Ilha Solteira.

Nos eventos reprodutivos de 2014, 2017 e 2019 não houve florescimentos para algumas progênies da procedência de MS. Para a procedência de SP, apenas no evento reprodutivo de 2018 todos as progênies apresentaram florescimento (Tabela 2 e Tabela 3). Nas duas procedências foi notado que o florescimento é constante em algumas progênies e que outras se mostraram menos adaptadas e com poucos ou nenhum indivíduo florescendo. As coletas de sementes devem considerar matrizes sem grau de parentesco. Quanto mais progênies de matrizes diferentes florescerem, maior diversidade será introduzida na próxima geração. Portanto, deve-se priorizar coletas de sementes de progênies de matrizes diferentes.

Tabela 2. Distribuição do florescimento de *Astronium fraxinifolium* em cinco eventos reprodutivos dentro de progênies da procedência de Selvíria-MS em teste de progênies localizado em Selvíria-MS. FTO: total de indivíduos com flores observados; FMO: indivíduos com flores masculinas observados, FFO: indivíduos com flores femininas observadas e R: Razão sexual de indivíduos de flores masculinas e femininas.

Ano	2014				2017				2018				2019				2020			
PROG	FTO	FMO	FFO	R	FTO	FMO	FFO	R	FTO	FMO	FFO	R	FTO	FMO	FFO	R	FTO	FMO	FFO	R
1	16	13	3	0,19	15	11	3	0,27	24	16	8	0,33	22	12	10	0,45	21	14	7	0,33
2	6	2	4	0,67	16	9	4	0,44	20	11	9	0,45	13	5	8	0,62	11	4	7	0,64
3	6	3	3	0,50	9	8	3	0,20	14	7	7	0,50	10	5	5	0,50	11	6	5	0,45
4	8	7	1	0,13	13	7	1	0,46	21	11	10	0,48	19	8	11	0,58	15	9	6	0,40
5	6	4	2	0,33	6	4	2	0,33	17	6	11	0,65	12	4	8	0,67	11	5	6	0,55
6	1	1	-	-	-	-	-	-	4	2	2	0,50	1	-	1	-	3	2	1	0,33
7	4	2	2	0,50	7	5	2	0,29	13	6	7	0,54	10	4	6	0,60	18	9	9	0,50
8	11	7	4	0,36	14	10	4	0,29	19	10	9	0,47	14	7	7	0,50	16	11	5	0,31
9	11	8	3	0,27	15	12	3	0,20	26	15	11	0,42	25	15	10	0,40	23	16	7	0,30
10	5	4	1	0,20	13	10	1	0,23	22	8	14	0,64	21	12	9	0,43	15	9	6	0,40
11	5	4	1	0,20	8	7	1	0,13	16	11	5	0,31	11	8	3	0,27	13	10	3	0,23
12	7	4	3	0,43	11	8	3	0,27	21	9	12	0,57	12	4	8	0,67	16	9	7	0,44
13	2	2	-	-	3	2	-	0,33	5	3	2	0,40	4	1	3	0,75	4	2	2	0,50
14	3	2	1	0,33	14	11	1	0,21	21	14	7	0,33	16	11	5	0,31	15	11	4	0,27
15	2	2	-	-	6	5	-	0,17	13	9	4	0,31	5	3	2	0,40	7	5	2	0,29
16	9	4	5	0,56	13	4	5	0,69	22	7	15	0,68	14	6	8	0,57	19	9	10	0,53
17	7	6	1	0,14	13	5	1	0,62	18	6	12	0,67	17	7	10	0,59	13	8	5	0,38
18	3	2	1	0,33	3	3	1	0,25	9	5	4	0,44	4	4	-	-	5	3	2	0,40
19	2	2	-	0,00	5	4	-	0,20	10	7	3	0,30	9	5	4	0,44	11	8	3	0,27
20	10	8	2	0,20	16	10	2	0,38	21	13	8	0,38	15	9	6	0,40	13	7	6	0,46
21	5	4	1	0,20	6	6	1	0,00	12	8	4	0,33	5	3	2	0,40	12	8	5	0,38
22	7	5	2	0,29	14	9	2	0,36	22	13	9	0,41	20	12	8	0,40	22	16	6	0,27
23	4	3	1	0,25	10	5	1	0,50	13	5	7	0,58	14	6	8	0,57	11	6	5	0,45
24	10	9	1	0,10	17	13	1	0,24	29	17	12	0,41	25	16	9	0,36	23	16	7	0,30
25	8	5	3	0,38	19	16	3	0,16	26	18	8	0,31	21	14	7	0,33	21	16	5	0,24
26	3	3	-	-	2	2	-	-	8	6	2	0,25	4	4	-	-	7	5	2	0,29
27	5	2	3	0,60	8	5	3	0,38	12	7	5	0,42	8	5	3	0,38	12	5	7	0,58
28	5	3	2	0,40	9	5	2	0,44	20	9	11	0,55	13	7	8	0,53	15	9	6	0,40
29	10	7	3	0,30	18	8	3	0,56	30	10	20	0,67	28	10	18	0,64	27	9	18	0,67
30	13	8	5	0,38	28	17	5	0,39	34	20	14	0,41	30	18	12	0,40	29	14	15	0,52
Total	194	136	58	0,30	331	221	58	0,33	542	289	252	0,47	422	225	199	0,47	439	261	179	0,41

Tabela 3. Distribuição do florescimento de *Astronium fraxinifolium* em cinco eventos reprodutivos dentro de progênies da procedências de Ilha Solteira-SP em teste de procedências e progênies localizado em Selvíria-MS. FTO: total de indivíduos com flores observados; FMO: indivíduos com flores masculinas observados, FFO: indivíduos com flores femininas observadas e R: Razão sexual de indivíduos de flores masculinas e femininas.

Ano	2014				2017				2018				2019				2020			
PROG	FTO	FMO	FFO	R	FTO	FMO	FFO	R	FTO	FMO	FFO	R	FTO	FMO	FFO	R	FTO	FMO	FFO	R
1	13	12	1	0,08	7	5	2	0,29	17	10	7	0,41	14	8	6	0,43	14	8	6	0,43
2	7	3	3	0,50	10	3	7	0,70	13	6	7	0,54	13	6	7	0,54	8	4	4	0,50
3	11	5	6	0,55	19	10	9	0,47	22	10	12	0,55	24	13	11	0,46	21	11	10	0,48
4	3	2	1	0,33	6	5	1	0,17	9	6	3	0,33	5	6	1	0,14	10	7	2	0,22
5	6	4	2	0,33	6	5	2	0,29	11	6	5	0,45	11	7	4	0,36	10	6	4	0,40
6	7	4	3	0,43	8	4	4	0,50	10	5	5	0,50	12	6	6	0,50	9	5	4	0,44
7	2	2	-	-	4	4	-	-	11	7	4	0,36	4	2	2	0,50	6	4	2	0,33
8	-	-	-	-	3	2	1	0,33	6	4	2	0,33	4	4	-	-	5	3	2	0,40
9	3	3	-	-	2	1	1	0,50	6	3	3	0,50	4	1	3	0,75	5	4	1	0,20
10	2	2	-	-	6	6	-	-	10	8	2	0,20	6	4	2	0,33	10	9	1	0,10
11	6	5	1	0,17	12	7	5	0,42	23	11	12	0,52	19	11	8	0,42	15	9	6	0,40
12	7	5	2	0,29	16	9	7	0,44	19	10	9	0,47	21	12	9	0,43	16	7	9	0,56
13	2	1	1	0,50	5	3	2	0,40	10	7	3	0,30	8	6	2	0,25	5	5	-	-
14	1	-	1	-	-	-	-	-	2	1	1	0,50	2	-	2	-	-	-	-	-
15	8	6	2	0,25	8	7	1	0,13	12	8	4	0,33	10	7	3	0,30	11	8	3	0,27
16	5	1	1	0,50	5	3	2	0,40	11	7	4	0,36	9	4	5	0,56	7	4	3	0,43
17	3	3	-	-	4	1	3	0,75	8	3	5	0,63	4	2	2	0,50	1	-	1	-
18	1	1	-	-	-	-	-	-	6	4	2	0,33	4	2	2	0,50	8	6	2	0,25
19	2	1	1	0,50	3	2	1	0,33	6	4	2	0,33	6	5	1	0,17	6	5	1	0,17
20	3	3	-	-	6	5	1	0,17	8	8	-	0,00	8	6	2	0,25	5	5	-	-
21	1	-	1	-	5	3	2	0,40	7	4	3	0,43	7	2	5	0,71	2	2	-	-
22	6	5	1	0,17	5	3	2	0,40	15	9	6	0,40	11	6	5	0,45	15	9	6	0,40
23	8	7	1	0,13	11	7	4	0,36	19	9	10	0,53	18	6	12	0,67	16	6	10	0,63
24	2	2	-	-	7	5	2	0,29	13	10	3	0,23	9	6	3	0,33	9	7	2	0,22
25	1	1	-	-	7	3	4	0,57	12	6	6	0,50	9	3	6	0,67	12	7	5	0,42
26	8	6	2	0,25	9	7	3	0,30	15	9	6	0,40	13	8	5	0,38	12	7	5	0,42
27	5	3	1	0,25	2	1	1	0,50	10	7	3	0,30	9	4	5	0,56	5	2	3	0,60
28	1	1	-	-	4	3	1	0,25	9	7	2	0,22	8	4	4	0,50	8	6	2	0,25
29	6	4	2	0,33	5	2	3	0,60	13	5	8	0,62	9	4	5	0,56	4	2	2	0,50
30	-	-	-	-	1	1	-	-	2	1	1	0,50	2	1	1	0,50	1	1	-	-
Total	130	92	33	0,26	186	117	71	0,38	335	195	140	0,42	283	156	129	0,45	256	159	96	0,38

Uma proporção desbalanceada de sexos implica na contribuição desigual do número de gametas favorecendo o sexo mais abundante (ZANON et al., 2009), a razão sexual enviesada reduz o tamanho efetivo populacional e afeta diretamente na conservação genética, devido aos gargalos genéticos (SINCLAIR et al., 2012; VENCovsky et al., 2012). Porém, a razão sexual está em função das populações, de sua procedência, do sistema de plantio, do tamanho amostral e da idade dos indivíduos em que a avaliação foi efetuada (ZULIAN et al., 2021).

Sabe-se que o tamanho efetivo populacional refere-se ao tamanho genético de uma população reprodutiva e não ao número de indivíduos que a compõe (RESENDE et al., 1997). Por isso foi calculado o tamanho efetivo populacional considerando os indivíduos que contribuem para a reprodução e a razão sexual deles em cinco eventos reprodutivos (Tabela 4 e Tabela 5). Como os indivíduos estão em um teste de procedências e progênes, e sabendo-se que a endogamia em espécies dioicas ocorre por meio de cruzamentos entre parentes (MANOEL et al., 2015) e quando há número reduzido de parceiros locais para cruzamento (VRANCKX et al., 2012), foi feito o ajuste com coeficiente de endogamia (f) obtido a partir do coeficiente de coancestria (Θ).

Em 2014 as duas procedências apresentaram o menor tamanho efetivo populacional, 76,06 para MS e 46,36 para SP, assim como o menor florescimento e razão sexual, que mais tendeu para indivíduos de flores masculinas. Com o aumento do florescimento e uma proporção mais próxima de 1:1, o tamanho efetivo foi maior, 146,13 (2017), 304,87 (2018), 224,74 (2019) e 227,33 (2020) para a procedência de MS e 82,57 (2017), 168,11 (2018), 142,48 (2019) e 118,77 (2020) para procedência de SP. Em todos os eventos reprodutivos o tamanho efetivo populacional foi maior para a procedência de MS, o que evidencia uma maior adaptação desta procedência em comparação com a de SP, que precisou se adaptar a novas condições edafoclimáticas, portanto, deve-se considerar que a adaptação dos indivíduos ao local do plantio é fundamental para que a espécie possa se reproduzir e gerar descendentes.

Considerando que para prevenção de depressão endogâmica um N_e de 50 é suficiente (FRANKHAM, 1995), as duas procedências possuem N_e suficiente em todos os eventos reprodutivos. Considerando o balanço entre deriva e mutação, para manutenção do potencial evolutivo da população, indefinidamente um N_e da ordem de 500 é necessário (FRANKHAM, 1995), o que até o momento não atingiram. Ainda assim, o N_e pode ser aumentado se considerarmos a junção das duas procedências. Para Vencovsky (1988), a reunião de amostras independentes de germoplasmas em uma

amostra composta, propicia uma ampliação do N_e e da variabilidade genética disponível, portanto, reunir procedências diferentes é importante para a conservação genética. Porém, salienta Frankham (1995), é preciso se preocupar com a minimização da endogamia e a perda de variação genética em uma conservação genética de populações. Neste sentido é necessário que haja um manejo dos testes de procedências e progênies que cumprem o papel de conservação *ex situ*, a eliminação de indivíduos aparentados reduzem a probabilidade de indivíduos endogâmicos na próxima geração.

Em conservações *ex situ*, para maximizar o N_e deve-se priorizar o aumento do N, manter igual tamanho de família, proporção de sexo próxima de 1:1 e um N_e desejável e constante através das gerações (FRANKHAM, 1995). Quanto à seleção, deve-se evitar a seleção entre famílias, e quanto à intensidade de seleção dentro de progênies Higa et al. (1992) dizem ser necessário manter a proporção sexual de 1:1 após a seleção; manter no mínimo 10 indivíduos de cada sexo por família, e deve-se evitar o cruzamento entre indivíduos aparentados e os cruzamentos polígamos.

Tabela 4. Tamanho efetivo esperado (N_e), tamanho efetivo corrigido com base na endogamia ($\hat{f} = 0,151$) estimada por Cornacini (Capítulo 3) (N_e'), razão sexual (r), número de plantas contribuindo para o evento reprodutivo ($\hat{t}$), número total de plantas masculinas (M), número total de plantas femininas (F), número total de plantas masculinas esperadas (N_m) e número total de plantas femininas esperadas (N_f) de *Astronium fraxinifolium* no TP-MS, instalado em 1996 em Selvíria-MS.

Ano	N_m	N_f	M	F	v	u	t	r	D_4	N_e	N_e'
2014	583	583	136	58	0,23	0,09	194	0,29	8,09	87,55	76,06
2017	581	582	221	110	0,38	0,19	331	0,33	7,36	168,20	146,13
2018	578	578	289	252	0,5	0,43	541	0,46	6,15	350,90	304,87
2019	575	576	225	199	0,39	0,34	424	0,47	6,54	258,68	224,74
2020	563	564	261	179	0,46	0,31	440	0,40	6,58	261,66	227,33

Tabela 5. Tamanho efetivo esperado (N_e), tamanho efetivo corrigido com base na endogamia ($\hat{f} = 0,142$) estimada por Cornacini (Capítulo 3) (N_e'), razão sexual (r), número de plantas contribuindo para o evento reprodutivo ($\hat{t}$), número total de plantas masculinas (M), número total de plantas femininas (F), número total de plantas masculinas esperadas (N_m) e número total de plantas femininas esperadas (N_f) *Astronium fraxinifolium* no TP-SP, instalado em 1996 em Selvíria-MS.

Ano	N_m	N_f	M	F	v	u	t	r	D_4	N_e	N_e'
2014	557	558	90	30	0,16	0,06	125	0,28	8,48	52,94	46,36
2017	557	557	117	69	0,21	0,12	186	0,37	7,60	94,29	82,57
2018	540	541	195	140	0,36	0,26	335	0,42	6,86	191,98	168,11
2019	536	537	256	129	0,29	0,24	285	0,45	6,97	162,72	142,48
2020	513	513	159	96	0,31	0,18	255	0,37	7,26	135,63	118,77

A desproporção sexual, apesar de diminuir o tamanho efetivo, segundo Munné-Bosch (2015), é uma característica chave para determinar a tolerância ao estresse nas plantas e, portanto, é preciso investigar em plantas dioicas os mecanismos de adaptação a estresses bióticos e abióticos combinados, principalmente para entender a evolução destas espécies no aquecimento global. Além disso, estudar mecanismos de determinação do sexo dessas espécies por meio de genes, ou sequências de pares de base que estão ligados à determinação do sexo, pode ser útil para compreender os mecanismos biológicos das espécies dioicas e consequentemente fornecer informações úteis para a conservação e melhoramento genético dessas espécies. Como exemplo, Yakubov et al. (2005) encontraram um marcador específico feminino para *Pistachia vera* (Anacardiaceae), permitindo a determinação do sexo antes da idade reprodutiva, abrindo caminhos para diferenciação sexual genética para espécies florestais dioicas.

4.4 CONCLUSÃO

É possível perceber o aumento do florescimento ao longo dos eventos reprodutivos nesse teste de procedências e progênies de *A. fraxinifolium*, com características de florescimento anual. Árvores de flores masculinas são as que primeiro florescem, mas com o tempo há o aumento de florescimento de árvores com flores femininas, a proporção sexual ficou próxima de 1:1 no evento reprodutivo de 2018, o que aumenta o tamanho efetivo. Em todos os eventos reprodutivos o tamanho efetivo se apresenta maior para a procedência de MS, o que indica uma maior adaptação desta procedência em comparação com a de SP. Portanto, deve-se considerar que a adaptação dos indivíduos ao local do plantio é fundamental para que a espécie possa se reproduzir e gerar descendentes. Um manejo no teste, considerando a proporção sexual, é recomendado para evitar cruzamentos biparentais e manter a diversidade genética nas próximas gerações. Precipitação e temperatura são fatores importantes para fenologia de espécies arbóreas que ocorrem no Cerrado. Nesse sentido, é necessário que investigações continuem para compreender melhor o florescimento e a biologia reprodutiva da espécie em conservações *ex situ*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, M.A.M. **Variabilidade genotípica e estrutura populacional de *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) em área degradada de Cerrado.** Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 77 p. 2019.
- ALLEM, A. C. **Estudo da biologia reprodutiva de duas espécies florestais (aroeira e gonçalo-alves) da região do cerrado.** Brasília, DF: Embrapa/CENARGEN, 1991. p. 1-5.
- AMORIM, F. W.; MENDES-RODRIGUES, C.; MARUYAMA, P. K.; OLIVEIRA, P. E. Sexual ratio and floral biology of the dioecious *Neea theifera* Oerst. (Nyctaginaceae) in a *cerrado rupestre* of central Brazil. **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 25, n. 4, p. 785-792, 2011.
- BAWA, K.S.. Evolution of dioecy in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematic** 11:15-39.1980.
- BERTONHA, L.J.; FREITAS, M.L.M.; CAMBUIM, J.; MORAES, M.L.T.; SEBBENN, A.M. Seleção de progênies de *Myracrodruon urundeuva* baseada em caracteres fenológicos e de crescimento para reconstituição de áreas de Reserva Legal. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 44, n. 109 p. 95104, 2016.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. **Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros por Satélite.** Acordo de Cooperação Técnica MMA/IBAMA: Monitoramento do Bioma Cerrado 2008 a 2009, Brasília, DF, p.55, 2011.
- BRITO, R.L.; ARAÚJO, E.I.D.P.; MACIEL, C.M.S.; PAULA, A.D.; TAGLIAFERRE, C. Fenologia de *Astronium graveolens* Jacq. em floresta estacional decidual em Vitória da Conquista, Bahia. **Ciência Florestal**, 28, 641-650. 2018.
- BORCHERT, R. Phenology and ecology of a tropical tree *Erythrina poeppigiana* O. F. Cook. **Ecology** 61:1065-1074. 1980.
- BULLOCK, S.H. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. **Biotropica** 17:287-301. 1985.
- CESÁRIO, L.F.; GAGLIANONE, M.C. Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. **Acta Botanica Brasilica**, 22, 828-833. 2008.
- CORNACINI, M.R.; SILVA, J.R.; CAMBUIM, J.; SANTOS, W.D.; MORAES, M.L.T.; AGUIAR, A.V. Desbaste seletivo em teste de procedências e progênies de *Astronium fraxinifolium* Schott com base na variabilidade genética. **Scientia Forestalis**, volume 45, n. 115, p.581-591, 2017.
- CUNNINGHAM, S.A. Measuring the relationship between floral duration and fruit set for *Hamelia patens* (Rubiaceae). **Biotropica** 26:227-229. 1994.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2018. 356 p.

FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Annual Review of Genetics**, v.29, p.305-327. 1995.

FREEMAN, D.C.; DOUST, J.L.; EL-KEBLAWI, A.; MIGLIA, K.J.; MCARTHUR, E.D. Sexual specialization and inbreeding avoidance in the evolution of dioecy. **Botanical Review** 63:65-92. 1997.

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world**. Croom Helm, London. 1985.

HIGA, AR.; RESENDE, M.D. V. de. Pomar de sementes por mudas um método para conservação genética "ex-situ" de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSENCIAS NATIVAS, 2. 1992. São Paulo. Anais. São Paulo. Instituto Florestal, v.4, p.1.217-1.224.

IBARRA-MANRÍQUEZ, G.; OYAMA, K. Ecological correlates of reproductive traits of Mexican rain forest trees. **American Journal of Botany** 79:383-394.1992.

LEITE, E.J. State-of-knowledge on *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics** Vol. 5/1, pp. 63–77. 2002.

LENZA, E.; OLIVEIRA, P.E. Biologia reprodutiva e fenologia de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae) em mata mesofítica de Uberlândia, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 443-451. 2006.

LENZA, E.; OLIVEIRA, P.E. Biologia reprodutiva de *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae), uma espécie dioica em mata de galeria do Triângulo Mineiro, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 179-190. 2005.

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**, v.64, n.3, p.108-116, 2015.

MARQUIS, R.J. Phenological variation in the Neotropical understory shrub *Piper arieianum*: causes and consequences. **Ecology** 69:1552-1565. 1988.

MORELLATO, L. P. C. **Fenologia de árvores, arbustos e lianas em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil**. 1991. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade de Campinas, Campinas, 1991.

MUNNÉ-BOSCH, S. Sex ratios in dioecious plants in the framework of global change. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 109, , p. 99–102, 2015.

NETO, S.P.M. **Árvores nativas do cerrado com potencial madeireiro**. 2008. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

OLIVEIRA, P.E. Dioecy in the cerrado vegetation of central Brazil. **Flora** 191:235-243. 1996.

OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E. Reproductive biology of wood plants in a cerrado community of central Brazil. **Flora** 195:311-329. 2000.

OPLER, P.A.; BAWA, K.S. Sex ratios in tropical forest trees. **Evolution** 32:812-821. 1978.

OPLER, P.A.; FRANKIE, G.W.; BAKER, H.G. Rain fall as a factor in the release, timing and synchronization of anthesis by tropical trees and shrubs. **Journal of Biogeography** 3:231-236. 1976.

PALUDO, G.F.; MANTOVANI, A.; KLAUBERG, C.; REIS, M.S. Estrutura demográfica e padrão espacial de uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (araucariaceae), na Reserva Genética Florestal de Caçador, Estado de Santa Catarina. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1109-1121. 2009.

REICH, P.B.; BORCHERT, R. Water stress and tree phenology in a tropical dry forest in the lowlands of Costa Rica. **Journal of Ecology** 72:61-74. 1984.

RENNER, S.S.; RICKLEFS, R.E. Dioecy and its correlates in the flowering plants. **American Journal of Botany** 82:596-606. 1995.

RESENDE, M.D.V., SIMEÃO, R.M., STURION, J. A. Fundamentos de genética de populações para conservação de germoplasma da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *In: Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso* (ALICE). *In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE*, 1.; *REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE*, 2., 1997, Curitiba. Anais. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1997. p. 173-207. (1997).

REYS, P.; GALETTI, M.; MORELLATO, P.C.L.; SABINO, J. Fenologia reprodutiva e disponibilidade de frutos de espécies arbóreas em mata ciliar no rio Formoso, Mato Grosso do Sul. **Biota Neotropical**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 309-318, 2005.

RIVA, L.C. **Crescimento, adaptação e qualidade da madeira em progênies de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* procedentes de áreas antropizadas**. 2020. 89f. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2020.

RIVERA, G.; BORCHERT, R. Induction of flowering in tropical trees by a 30-min reduction in photoperiod: evidence from field observations and herbarium specimens. **Tree Physiology** 21:201-212. 2001.

SANT'ANA, V.Z. **Proporção sexual em populações de *Myracrodruon urundeuva* para fins de formação de pomares de sementes por mudas**. 2017. 64p. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2017.

SANTOS, R.M.; VIEIRA, F.A.; FAGUNDES, M.; NUNES, Y.R.F.; GUSMÃO, E. Riqueza e similaridade florística de oito remanescentes florestais no norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 135-144, 2007.

SAUL, F.A.C. **Progênies de *Myracrodruon urundeuva* fr. All. Em diferentes sistemas de plantio para fins de conservação genética *ex situ***. 2020. 74f. Dissertação (Mestrado

em Sistema de Produção) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2020.

SINCLAIR, J. P.; EMLIN, J.; FREEMAN, D. C. Biased sex ratios in plants: theory and trends. **Botanical Review**, New York, v. 78, n. 1, p. 66-86, 2012.

TANURDZIC, M.; BANKS, J.A. Sex-determining mechanisms in land plants. The **Plant Cell** 16:61-71. 2004.

VENCOVSKY, R.; CHAVES, L.J.; CROSSA, J. Variance effective population size for dioecious species. **Crop Science**, Madison, v.52, n.1, p.79-90, 2012.

VENCOVSKY, R. Preservação e genética de populações. *In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS*, 1988. Jaboticabal. Anais. Jaboticabal: FCAVJ/UNESP. 1988, p.67-74.

VRANCKX, G.; JACQUEMYN, H.; MUYS, B.; HONNAY, O. et al. Meta-analysis of susceptibility of woody plants to loss of genetic diversity through habitat fragmentation. **Conservation Biology**, Cambridge, v.26, p.228–237, 2012.

YAKUBOV, B.; BARAZANI, O. GOLAN-GOLDHIRSH, A. Combination of SCAR primers and Touchdown-PCR for sex identification in *Pistacia vera* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 103, n. 4, p. 473–478, 2005.

WRIGHT, S.J.; van SCHAIK, C.P. Light and the phenology of tropical trees. **American Naturalist** 143:192-199. 1994.

ZANON, M.L.B.; FINGER, C.A.G.; SCHNEIDER, P.R. Proporção da diócia e distribuição diamétrica de árvores masculinas e femininas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze, em povoamentos implantados. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 4, p. 425- 431, 2009.

ZULIAN, D.F.; CAMBUIM, J.; SAUL, F.A.C.; RIVA, L.C.; ALVES, P.F.; MORAES, M.A.; CORNACINI, M.R.; MARINO, C.L.; ROSSINI, B.C.; MORAES, M.L.T. Produção de sementes melhoradas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Alemão). *In: Evangelista, W.V. Produtos Florestais Não Madeireiros: tecnologia, mercado, pesquisas e atualidades*. Guarujá, SP: Científica Digital [livro eletrônico]. 2021.

5. CAPITULO 2

DESENVOLVIMENTO DE 20 MARCADORES SSRs DERIVADOS DE cDNA PARA *Astronium fraxinifolium* SCHOTT (ANACARDIACEAE)

CORNACINI, M.R.; MANOEL, R.O.; ALCANTARA, M.A.; MORAES, M.L.; SILVA, E.A.; NETO, L.G.P.; SEBBENN, A.M.; ROSSINI, B.C.; MARINO, C.L. Detection and application of novel SSR markers from transcriptome data for *Astronium fraxinifolium* Schott, a threatened Brazilian tree species. **Molecular Biology Reports**, 48(4), 3165-3172. 2021.

RESUMO

Astronium fraxinifolium é uma espécie arbórea ameaçada de extinção no Brasil. Devido sua importância no reflorestamento ambiental, bem como na exploração continuada de sua madeira, é necessário desenvolver programas de manejo que apoiem a conservação da espécie. As repetições de sequência simples (SSR) ou marcadores microsatélites são amplamente usados em estudos de genética populacional em uma variedade de organismos. Neste estudo, apresentam-se os primeiros marcadores SSR desenvolvidos para *A. fraxinifolium*, bem como sua frequência e distribuição com base nos dados de transcriptoma. A partir dos dados do transcriptoma, foi identificado mais de 100 mil sequências apresentando microsatélites, com distribuição predominante de repetições trinucleotídicas. Na triagem inicial, foram selecionados 20 locos microsatélites que foram validados e avaliados quanto aos índices genéticos em duas populações naturais. Todos os *loci* são polimórficos, variando de quatro a 11 alelos por *locus*. As heterozigosidades observadas e esperadas variaram de 0 a 1,0 e de 0,533 a 1,0, respectivamente, enquanto a diferenciação genética ($= 0,363$) foi maior dentro do que entre as populações. Os *loci* SSR desenvolvidos a partir de dados de RNA-Seq fornecem uma base para estudos futuros sobre diversidade genética e estrutura populacional, sistema de acasalamento e fluxo gênico para populações de *A. fraxinifolium* e espécies relacionadas, visando a conservação e manejo.

Palavras-chave: Anacardiaceae, genética da conservação, manejo, marcadores microsatélites, genética de populações.

5.1 INTRODUÇÃO

A fragmentação da floresta tem um impacto direto na diversidade genética, estrutura populacional, sistema de acasalamento e fluxo gênico de populações de árvores. Os estudos de genética populacional baseados em marcadores genéticos são fundamentais para compreender os efeitos das atividades antrópicas nas populações naturais, nos esforços de conservação e no melhoramento das espécies de árvores. A espécie *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) está distribuída de forma descontínua por vários biomas no Brasil, ocorrendo em terrenos rochosos do Cerrado à Caatinga (LEITE, 2002; CARVALHO, 2010). É uma árvore dioica, polinizada por insetos, frequentemente utilizada na restauração de áreas degradadas (CARVALHO, 2010). Devido à extensa fragmentação de seus biomas, *A. fraxinifolium* é classificada como ameaçada de extinção, e as populações remanescentes são frequentemente encontradas como árvores isoladas ao longo de rodovias ou em pequenos fragmentos florestais (IBAMA, 1992; AGUIAR et al., 2003). Assim, o desenvolvimento de marcadores genéticos, como *loci* microssatélites (SSR), é urgentemente necessário para melhor compreender a diversidade genética, estrutura populacional, sistema de acasalamento e fluxo gênico das populações restantes.

Os estudos genômicos do gênero *Astronium* são raros. Recentemente, o uso de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento facilitou o desenvolvimento de marcadores moleculares para uma ampla gama de espécies (SOUZA et al., 2018; GONZÁLEZ-CASTELLANO et al., 2018; FRAGA et al., 2020; HOU et al., 2020). A capacidade de pesquisar dentro desses conjuntos de dados aumentou as chances de encontrar SSRs sem qualquer enriquecimento prévio. A partir disso, o desenvolvimento de marcadores SSR a partir de sequências de transcriptoma tornou-se uma ferramenta eficaz para estudos de genética populacional (ZHENG et al., 2013; ZHOU et al., 2016; LU et al., 2020), principalmente para espécies ameaçadas de extinção (ZHOU et al., 2016). Neste trabalho, foi desenvolvido um conjunto de 20 *loci* microssatélites polimórficos para *A. fraxinifolium* e avaliamos sua frequência e distribuição com base em dados de sequência de RNA gerada pela Illumina (RNA-Seq). Também foi incluída uma análise de repetições e classificação GO das leituras. Os *loci* foram validados quanto à reprodutibilidade e à aplicabilidade para avaliar a diversidade genética, sistema de acasalamento e fluxo gênico para esta espécie de árvore.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Coleta de amostra e extração de DNA para validação

Para validação, foram coletadas folhas frescas de 60 indivíduos de *A. fraxinifolium* de duas populações naturais. A primeira população incluiu 30 indivíduos amostrados ao longo da rodovia SP-595 no município de Ilha Solteira, estado de São Paulo (20°21' 36,46"S, 051°01'15,52"W), Brasil, que é característico da Floresta Sazonal Semidecidual. A segunda população é composta por 30 árvores adultas localizadas ao longo da rodovia BR-158 no município de Selvíria, estado de Mato Grosso do Sul (20°12'02,30"S, 051°14'56,81"W), Brasil, que é característico de bioma Cerrado. A autorização para coleta de amostras de tecido foliar foi fornecida pelo Instituto de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), do Ministério do Meio Ambiente (MMA), protocolo números 41166-1 e 73998-1.

5.2.2 Identificação e caracterização de loci SSR

Primers microssatélites específicos foram gerados a partir de uma biblioteca genômica de cDNA da espécie (PEREIRA-NETO, 2016) (dados não publicados) e submetidos a sequenciamento de nova geração (HiSeq Sequencing 2500 System, Illumina). Resumidamente, utilizando o kit NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), o RNA total foi extraído do eixo embrionário fresco de sementes coletadas nos municípios de Alto Paraíso, Cavalcante, Colinas do Sul e Niquelândia em Goiás, e Montes Claros, Mirabela e Lontra em Minas Gerais. A coleta de sementes foi autorizada pelo ICMBio, protocolo número 41166-1. A biblioteca foi construída usando o TrueSeq RNA Library Prep Kit V2 (Illumina) e sequenciada com uma execução emparelhada de 2x100bp. Para desenvolver marcadores microssatélites úteis para estudos de genética populacional, consideramos um subconjunto de quatro amostras desta execução. O software SSR-pipeline (MILLER et al., 2013) foi usado para pesquisar SSRs considerando os parâmetros de di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos para um mínimo de sete, seis, cinco, quatro e três repetições, respectivamente, com uma sequência de flanqueamento de 40pb. Esse *software* usa as leituras de dados brutos como entrada, que são processadas em um módulo de classificação de qualidade, seguido por um alinhamento de leituras e uma busca final por SSRs. O projeto do *primer* foi conduzido

em BatchPrimer3 v1.0 (YOU et al., 2008). Anotações funcionais de sequências de codificação contendo SSR foram analisadas no *software* Blast2GO, usando o banco de dados EnsemblePlants da UniProt (GOTZ et al., 2008). As sequências identificadas foram depositadas no Targeted Locus Study (TLS) da NCBI sob o BioProject PRJNA70516.

Para a análise populacional, o DNA genômico foi isolado de folhas frescas usando o protocolo de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (DOYLE; DOYLE, 1990) quantificado com um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, DE, EUA). A integridade foi verificada executando géis de agarose a 1% com um TBE (1X) a uma voltagem constante de 5 V/cm. Selecionamos 20 *loci* SSR para validação populacional. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com a adição de uma cauda M13 para marcação fluorescente (SCHUELKE, 2000). A mistura de reação continha 5,0 µL de GoTaq Incolor Master Mix, 0,3 µL de primer direto (2 pmol), 0,3 µL de primer reverso (8 pmol) 0,3 µL de primer fluorescente com M13 (8 pmol; 6-FAM, VIC, PET ou NED, Applied Biosystems), 0,5 µL de albumina de soro bovino (BSA, 0,1 mg/ml da Promega Corporation), 1,0 µL de DNA genômico (aproximadamente 50 ng) e água sem nuclease para um volume de reação final de 10 µL. O programa de PCR foi o seguinte: 2 min a 96°C; 35 ciclos de 30s a 96°C; uma temperatura de recozimento específica do primer (material suplementar S2) por 1 min 30s; 72°C durante 1 min 30 s; seguido por 12 ciclos de 96°C por 30s; 53°C por 1 min 30 s; 72°C durante 1 min 30 s; e uma extensão final a 72°C por 20 min. Os produtos de PCR foram genotipados em um analisador genético ABI3130xl (Applied Biosystems) com GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) (material suplementar S3). Os genótipos foram atribuídos usando o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

5.2.3 Análise estatística populacional

O número de alelos por loco (k), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foram estimados usando o *software* CERVUS 3.03 (KALINOWSKI et al., 2007). O índice de fixação (F) e o desequilíbrio de ligação genotípica (LD) foram estimados para cada população usando FSTAT (GOUDET, 2002). Para testar se os valores de LD eram significativamente diferentes de zero, usamos permutações de Monte Carlo e uma correção de Bonferroni (95%, $\alpha = 0,05$).

O programa Micro-Checker v.2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) foi utilizado para detectar a ocorrência de alelos nulos (*Null*) e a diferenciação genética (G'_{ST}) foi estimada com base nas estatísticas de Hedrick (HEDRICK, 2005). O pacote *adegenet* no ambiente de *software* R foi usado para conduzir a análise de componentes principais (PCA), a análise discriminante de componentes principais (DAPC) e a probabilidade de atribuição de cada indivíduo (JOMBART; ALMED, 2011). Além disso, uma análise Bayesiana foi realizada no *software* STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000), assumindo um modelo de mistura com frequências de alelos correlacionadas, testando cada K (1-4) com 10 execuções independentes usando um burn-in de 100.000 e 1.000.000 gerações. A identificação do K ótimo foi inferida usando o método de Evanno (EVANNO et al., 2005) no programa Structure Harvester (EARL; VONHOLDT, 2012).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Identificação e classificação de marcadores SSR

Neste estudo, a execução da sequência produziu 189 milhões de leituras emparelhadas, das quais mais de 95 milhões foram unidas com sucesso. Os motivos trinucleotídicos foram os mais abundantes, seguidos por di-, hexa-, penta e tetranucleotídeos (aproximadamente 37,38; 13,20; 8,85 e 5,43%, respectivamente, Tabela 1). Destes, uma média de 32% das sequências possuía regiões flanqueadoras suficientes para projetar primers, exceto para os loci tetra e trinucleotídicos, nos quais o número de sequências com regiões flanqueadoras foi de 40,9 e 36,9%, respectivamente. Em uma triagem inicial, mais de 113.000 foram identificados com repetições em tandem. Posteriormente, projetaram-se 20 pares de *primers* para amplificação e teste por meio de análise populacional.

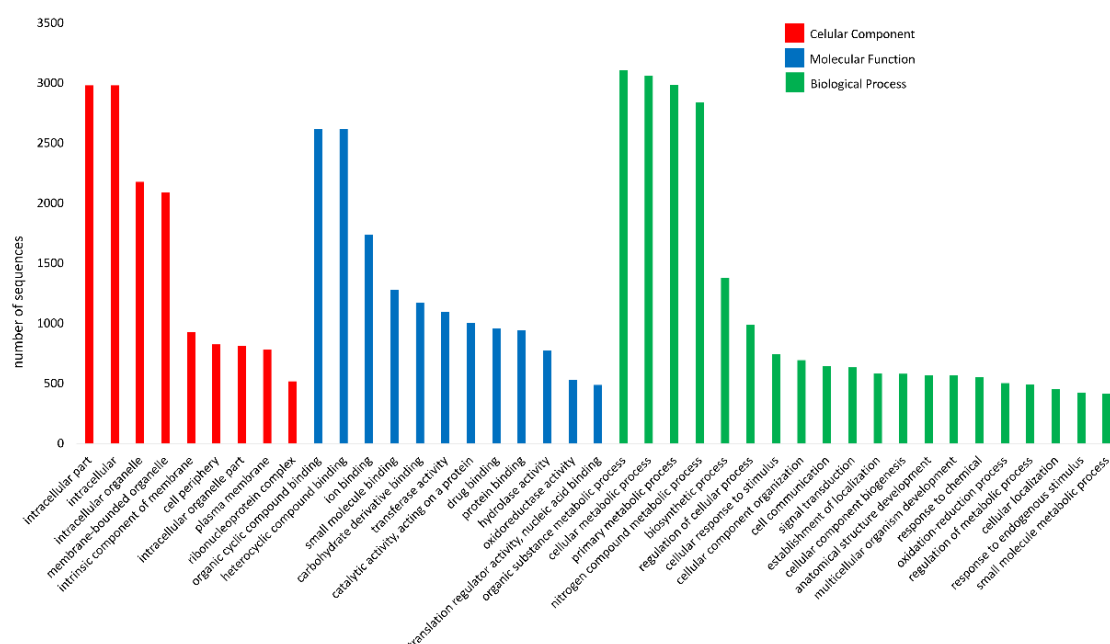
Tabela 1. Resumo dos dados de sequenciamento *paired-end* da Illumina; incluindo motivos perfeitos e não-perfeitos di-, tri-, tetra-, penta- e hexa-nucleotídeos para *Astronium fraxinifolium*.

Motivo	Di-	Tri-	Tetra-	Penta-	Hexa-
Número de contigs contendo microssatélites	146.182	163.062	13.274	29.540	38.160
Número de contigs com sequência de flanqueamento	37.389	60.331	5.434	8.852	13.202

Número total de leituras = 189.057.492; Todos os contigs = 95.768.009

A anotação funcional SSR foi classificada considerando as três categorias principais: componente celular, função molecular e processo biológico (Figura 1). A classificação GO referente ao componente celular mostrou que os mais abundantes são intracelulares (GO: 0005622) ou parte intracelular (GO: 0044424). Para a função molecular, os GOs mais representativos foram relacionados à ligação do composto orgânico cíclico (GO: 0097159) e ligação do composto heterocíclico (GO: 1901363). A categoria de processos biológicos foi representada principalmente por genes envolvidos no processo metabólico de substâncias orgânicas (GO: 0071704) e no processo metabólico celular (GO: 0044237). Considerando o tecido analisado na análise do transcriptoma, a classificação GO também mostra um grande número de genes relacionados à comunicação celular (GO: 0007154), desenvolvimento da estrutura anatômica (GO: 0048856) e desenvolvimento de organismos multicelulares (GO: 0007275). Estes são consistentes com os estágios iniciais de desenvolvimento e sugerem um potencial significativo para estudos futuros nessas regiões.

Figura 1: Anotação funcional de SSRs em regiões codificantes do transcriptoma de *Astronium fraxinifolium*, incluindo o número de genes supostamente envolvidos em diferentes funções subcelulares com base na classificação GO.



4.3.2 Diversidade genética de populações naturais

O uso de SSRs derivados de RNA-Seq aumentou o sucesso da amplificação, inclusive para espécies relacionadas, devido à conservação das regiões flangeadoras transcritas. Todos os pares de *primers* microssatélites desenhados foram amplificados com sucesso e apresentaram polimorfismo para as populações estudadas, com quatro a 11 alelos detectados por locus e valores variando de 0,346 a 0,857 (Tabela 2), indicando que os marcadores são adequados para estudos populacionais.

Tabela 2: Resultados da triagem em duas populações de *Astronium fraxinifolium*.

Locos	Ilha Solteira-SP ($n = 30$)						Selvária-MS ($n = 30$)						G'_{ST}
	k	PIC	H_o	H_e	F	$Null$	k	PIC	H_o	H_e	F	$Null$	
Ga01	8	0.760	0.933	0.799	-0.171	-	9	0.754	0.654	0.792	0.177*	-	0.757
Ga02	11	0.551	0.867	0.626	-0.394	-	7	0.784	0.808	0.824	0.105	-	0.513
Ga03	8	0.346	0.000	0.533	0.094	-	8	0.632	0.367	0.680	0.337*	+	0.091
Ga04	11	0.788	0.467	0.818	0.434*	+	10	0.804	0.533	0.836	0.366*	+	0.044
Ga05	8	0.656	0.367	0.718	0.494*	+	5	0.664	0.296	0.726	0.597*	+	0.785
Ga06	9	0.755	0.733	0.797	0.081*	-	8	0.712	0.769	0.754	-0.020	-	0.959
Ga07	10	0.762	0.800	0.804	0.005	-	8	0.693	0.630	0.746	0.158*	-	0.484
Ga08	8	0.840	0.933	0.871	-0.073	-	8	0.719	0.821	0.769	-0.069	-	0.583
Ga09	10	0.805	0.667	0.833	0.202*	+	11	0.857	0.733	0.885	0.174*	+	0.337
Ga10	7	0.569	0.308	0.654	0.475*	+	4	0.725	0.600	0.785	0.106	-	0.263
Ga11	8	0.724	0.800	0.777	-0.030	-	6	0.785	0.731	0.827	0.159*	-	0.058
Ga12	8	0.657	0.944	0.730	-0.175	-	6	0.743	0.800	0.799	0.137*	-	0.314
Ga13	7	0.756	0.722	0.810	0.124*	-	8	0.725	0.762	0.779	0.089	-	0.194
Ga14	9	0.734	0.722	0.794	0.069	-	8	0.746	0.824	0.804	0.133*	-	0.088
Ga15	8	0.711	0.826	0.769	0.085	-	8	0.757	0.500	0.817	0.377*	+	0.013
Ga16	9	0.580	0.600	0.623	0.038	-	6	0.761	0.724	0.797	0.093	-	0.693
Ga17	5	0.669	0.828	0.721	-0.129	-	8	0.655	0.567	0.719	0.215*	-	0.340
Ga18	8	0.690	0.655	0.743	0.125	-	11	0.815	0.733	0.849	0.138*	-	0.149
Ga19	4	0.558	0.552	0.634	0.140	-	7	0.551	0.133	0.606	0.783*	+	0.086
Ga20	8	0.710	0.759	0.760	0.010	-	9	0.781	0.733	0.821	0.109	-	0.072
Mean	8.2	0.681	0.674	0.741	-0.029	-	7.5	0.720	0.668	0.797	0.059	-	0.363

k = número de alelos por loco; PIC = conteúdo de informação de polimorfismo; H_o = heterozigosidade observada; H_e = heterozigosidade esperada; F = índice de fixação; $Null$ = ocorrência de alelos nulos; G'_{ST} = diferenciação genética entre populações; $P < 0.05$

Apesar do histórico de fragmentação das populações de *A. fraxinifolium*, os locos SSR apresentaram grande variação genética: para Ilha Solteira a heterozigosidade observada (H_o) variou de 0 a 0,944 (média de 0,674) e a heterozigosidade esperada (H_e) de 0,533 a 0,871 (média de 0,741); em Selvária, a H_o variou de 0,133 a 1,0 (média de 0,668) e a H_e de 0,606 a 1,0 (média de 0,797). O índice de fixação (F) variou de -0,394 a 0,494 (média de 0,090) para Ilha Solteira, e de -0,069 a 0,783 (média de 0,162) para Selvária. Alelos nulos foram observados em quatro e seis locos em Ilha Solteira e Selvária, respectivamente. Após a correção de Bonferroni, o desequilíbrio de ligação genotípico (LD) foi observado em quatro pares de locos em Ilha Solteira e três pares em Selvária (Tabela 3).

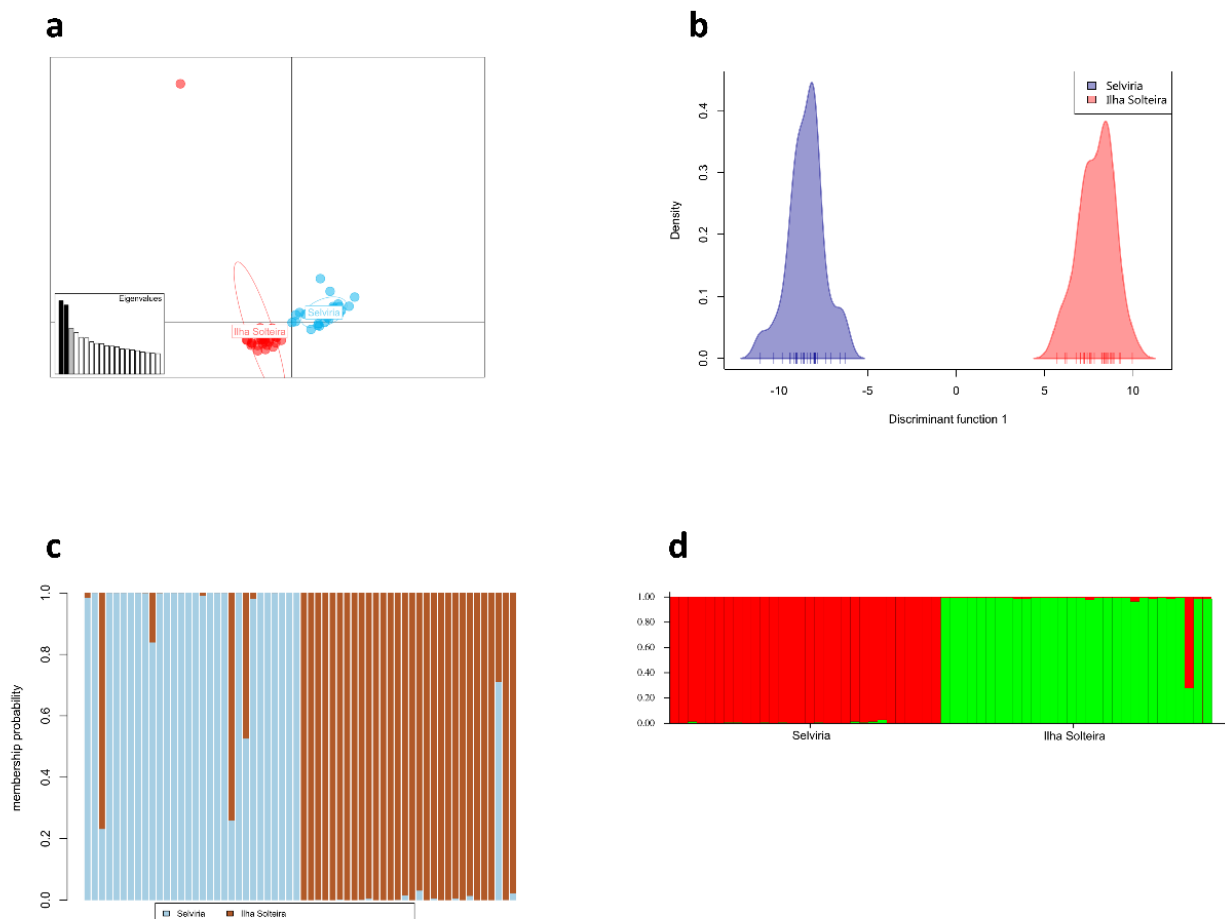
Tabela 3: Desequilíbrio genotípico entre locos microssatélites em pares em adultos de *Astronium fraxinifolium*.

Pares de locos	Ilha Solteira	Selvíria
Ga01xGa05	0.00005	1.00000
Ga01xGa06	0.00005	1.00000
Ga01xGa07	0.00005	1.00000
Ga01xGa08	0.00011	1.00000
Ga01xGa19	0.89137	0.00005
Ga01xGa20	0.73405	0.00005
Ga02xGa03	0.00047	0.00005

Os valores representam a probabilidade de desequilíbrio genotípico após 19.000 permutações de alelos entre indivíduos. Probabilidade após as correções de Bonferroni: $P = 0,000263$ ($\alpha = 0,05$).

Para testar a similaridade genética entre as populações, foram usadas as análises de DAPC e STRUCTURE. A diferenciação genética (G'_{ST}) entre as populações (0,363) foi alta, sugerindo que uma grande proporção da diversidade genética é distribuída dentro, e não entre as populações. A alta diferenciação genética entre as populações era esperada dada a distância geográfica (50 km). No entanto, essa diferenciação também pode ser explicada pelo fato de que a espécie é polinizada por abelhas, que mostraram dispersar pólen em distâncias limitadas (LEITE, 2002). A PCA mostrou uma clara diferenciação entre as populações, com alguns indivíduos misturados entre si. Além disso, o DAPC e os resultados de ambos os testes de probabilidade de atribuição (pacote adegenet e STRUCTURE) mostraram resultados semelhantes para a estrutura da população com duas populações distintas (Figura. 2).

Figura 2: Análise de componentes principais (PCA), análise discriminante de componentes principais (DAPC) e testes de atribuição para duas populações analisadas de *Astronium fraxinifolium*: (A) PCA mostrando a distribuição dos genótipos; (B) DAPC mostrando claramente as diferenças entre as populações. As cores em (A) e (B) indicam a população: Ilha Solteira (vermelho) e Selviria (azul). (C) Teste de atribuição do pacote adegenet. (D) STRUCTURE resulta da análise de $K = 2$ ótimo. (C) e (D) Cada coluna e cor indicam a atribuição genética dos indivíduos: (C) Ilha Solteira (marrom) e Selvíria (azul); (D) Ilha Solteira (verde) e Selvíria (vermelho).



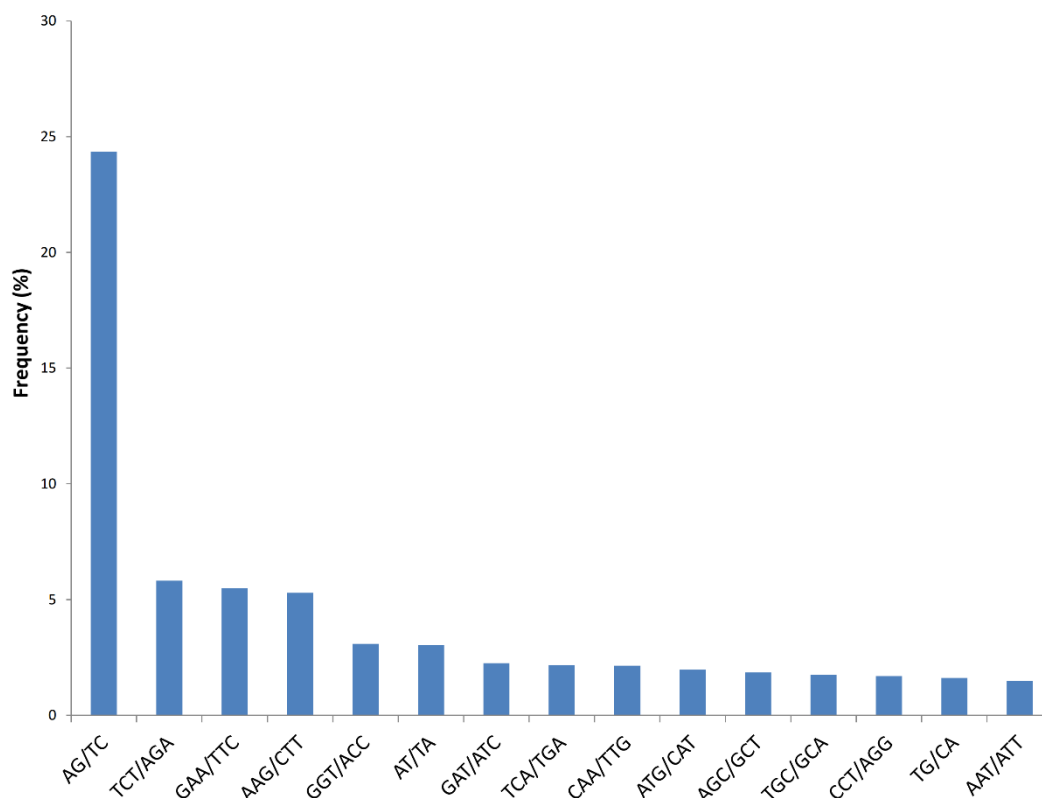
5.3 DISCUSSÃO

A partir dos dados do transcriptoma de *A. fraxinifolium*, foi identificada uma predominância de trinucleotídicos, seguida por motivos dinucleotídicos, representando mais de 79% de todos os *contigs* identificados, o que não poderia afetar a estrutura da proteína (LI et al., 2004; MRÁZEK et al., 2007). Ao analisar o número de repetições, identificamos que aquelas com mais de 10 correspondem a menos de 7,8% de todos os SSRs (Tabela 4). A frequência de SSR diminuiu com um aumento no comprimento do motivo, como também foi relatado para *Magnolia wufengensis* (WANG et al., 2019). A frequência de motivos de AG / CT corresponde a mais de 24,3% e é o motivo mais abundante nesta espécie, seguido por repetições TCT / AGA, com menos de 6% (Figura 3). A frequência de repetições AG / CT são maiores do que as encontradas para outras espécies, como bambu (17,11%) (LI et al., 2004), mas menores do que a encontrada para Magnólia (37,8%) (WANG et al., 2019). Altas frequências de repetições de AG foram relatadas para outras espécies de plantas, sugerindo que essas frequências podem estar relacionadas a mecanismos de mutação na geração de SSRs ou pressão seletiva em sequências particulares (CHO et al., 2000; LI et al., 2004; MRÁZEK et al., 2007; WANG et al., 2016; CAI et al., 2019; WANG et al., 2019).

Tabela 4: Distribuição de frequência dos SSRs identificados no transcriptoma de *Astronium fraxinifolium*.

Número de repetição	Di-	Tri-	Tetra-	Penta-	Hexa-	Total
4	N/A	N/A	N/A	6685	11008	17693
5	N/A	N/A	3003	1740	1644	6387
6	N/A	33155	2139	365	466	36125
7	13340	15352	217	56	55	29020
8	6167	7539	52	3	20	13781
9	5489	2413	10	2	4	7918
10	3511	1013	4	0	2	4530
>10	8882	859	9	1	3	9754
Total	37389	60331	5434	8852	13202	125208

Figura 3: Distribuição de frequência dos tipos de motivos SSR mais representativos no transcriptoma de *Astronium fraxinifolium*.



Os marcadores microsatélites desenvolvidos foram eficazes para avaliar a diferenciação genética entre as populações amostradas. Os níveis médios de heterozigiosidade observada e esperada foram maiores do que os relatados para populações de *Astronium graveolens* (SANCHEZ-GOMEZ et al., 2020) e para outras espécies tropicais, como populações de *Cedrela fissilis* (Meliaceae) (GANDARA et al., 2014), *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae) (GÓES et al., 2019), *Myracrodruon urundeuva* (SOUZA et al., 2018) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (SARZI et al., 2019), o que confirma a alta variabilidade genética encontrada nas populações aqui avaliadas. Portanto, esses marcadores genéticos são confiáveis para uso em estudos de genética populacional, como a investigação de padrões de dispersão de pólen e de sementes. Esses estudos podem ajudar a entender a distribuição real das populações naturais, que reflete a história evolutiva das espécies. Estudos anteriores em outras espécies de árvores mostram longa distância para a dispersão de pólen, por exemplo, com dispersão de pólen para *Hymenaea stignocarpa* atingindo mais de 8 km entre as populações analisadas (MORAES et al., 2018), e para *Ceiba pentandra* atingindo até 18 km (GRIBEL; LEMES, 1997; DICK et al., 2008). No entanto, essas distâncias estão principalmente relacionadas à dispersão por morcegos, que possuem uma grande área de forrageamento. *A.*

fraxinifolium é polinizada por abelhas, e análises de comportamento de insetos relataram distâncias de forrageamento de até 6 km (HAGLER et al., 2011; ABOU-SHAARA, 2014). Tais resultados indicam que análises adicionais de dispersão de pólen / sementes são necessárias para esta espécie. Até o momento, poucos estudos foram conduzidos em populações naturais de *A. fraxinifolium* e a maioria enfocou características silviculturais (AGUIAR et al., 2003). Estudos recentes descreveram *loci* SSR para *A. graveolens*, mas nenhuma outra análise foi conduzida em outras espécies de *Astronium* (SANCHEZ-GOMEZ et al., 2020). Portanto, os marcadores microssatélites aqui desenvolvidos são úteis para estudos de diversidade e estrutura genética, fluxo gênico e sistema de acasalamento, o que fornece informações para a conservação, melhoramento e reflorestamento das espécies. Além disso, o estudo fornece um banco de dados com mais de 125.000 sequências SSR expressas no genoma que servirá como base para análises das consequências da fragmentação florestal nas florestas tropicais do Brasil. Como tal, contribui para o desenvolvimento de estratégias adequadas para a conservação de *A. fraxinifolium* e espécies relacionadas da família Anacardiaceae.

Este estudo apresenta os primeiros marcadores SSR para *A. fraxinifolium*. A frequência e distribuição dos motivos SSR mostram altos níveis de diversidade, com predominância de trinucleotídeos, como já foi relatado para outras espécies de plantas. A anotação funcional de SSRs pode ajudar futuros programas de melhoramento na seleção de genes relacionados a características importantes de desenvolvimento. Além disso, o uso de SSRs derivados do transcriptoma pode aumentar a taxa de amplificação em espécies relacionadas, devido à conservação das regiões flanqueadoras desses *loci*. No nível da população, esses marcadores SSR mostram níveis suficientes de polimorfismo. Portanto, os resultados sugerem que esses marcadores podem ser usados como ferramentas para estudos de genética populacional ecológica, como diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de acasalamento e fluxo gênico, ao mesmo tempo em que ajudam a melhorar o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo genético de fragmentados populacionais e espécies relacionadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-SHAARA, H.F. The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: a review. **Veterinarni Medicina** 59(1): 1-10. 2014.
- AGUIAR, A.V.; BORTOLOZO, F.R.; MORAES, M.L.T.; COSTA ANDRADE, J. A. Genetic variation in *Astronium fraxinifolium* populations in consortium. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 3(2): 95-106. 2003.
- CAI, K.; ZHU, L.; ZHANG, K.; LI, L.; ZHAO, Z.; ZENG, W.; LIN, X. Development and characterization of EST-SSR markers from RNA-Seq data in *Phyllostachys violascens*. **Frontiers in Plant Science** 10: 50. 2019.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies arbóreas brasileiras, Brasília: Embrapa Informação tecnológica; **Colombo: Embrapa Florestas**. 231-240. 2010.
- CHO, Y.G.; ISHII, T.; TEMNYKH, S.; CHEN, X.; LIPOVICH, L.; MCCOUCH, S. R.; PARK, W.D.; AYRES, N.; CARTINHO, S. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor Appl Genet** 100: 713-722. 2000.
- 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** 1: 20-33. 2008.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15. 1990.
- EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conserv Genet Resour.** 4(2): 359-361. 2012.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology** 14(8): 2611-2635. 2005.
- FRAGA, D.A.; CARVALHO, A.F.; SANTANA, R.S.; MACHADO, M. C.; LACORTE, G.A. Development of microsatellite markers for the threatened species *Coleocephalocereus purpureus* (Cactaceae) using next-generation sequencing. **Molecular Biology Reports** 47: 1485-1489. 2020.
- GANDARA, F.B.; TAMBARUSSI, E.V.; SEBBENN, A.M.; FERRAZ, E. M.; MORENO, M. A.; CIAMPI, A.Y.; VIANELLO, R.P.; GRATTAPAGLIA, D.; KAGEYAMA, P.Y. Development and characterization of microsatellite loci for *Cedrela fissilis* Vell (Meliaceae), an endangered tropical tree species. **Silvae Genetica** 63: 240-243. 2014.
- GÓES, B.D.; RUAS, E.A.; BENÍCIO, L.M.; CASSIANO, D.; SOUZA, F.P.; RUAS, P.M. Development and characterization of microsatellite loci for *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae) and cross amplification in related species. **Acta Scientiarum. Biological Sciences** 41(1): 43454. 2019.
- GONZÁLEZ-CASTELLANO, I.; PERINA, A.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A.M.; TORRECILLA, Z.; MARTÍNEZ-LAGE, A. Isolation and characterization of 21

polymorphic microsatellite loci for the rockpool shrimp *Palaemon elegans* using Illumina MiSeq sequencing. **Scientific Reports** 8: 17197. 2018.

GOUDET, J. FSTAT version 2.9.3.2, a program to estimate and test gene diversities and fixation index. **Institute of Ecology**, Lausanne, Switzerland. 2002.

GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J.M.; TEROL, J.; WILLIAMS, TIM D.; NAGARAJ, S.H.; NUEDA, M.J.; ROBLES, M.; TALÓN, M.; DOPAZO, J.; CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research** 36(10): 3420–3435. 2008.

GRIBEL, R.; LEMES, M.R. Mating system and pollen flow of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazon Assessment of levels and dynamics of intra-specific genetic diversity of tropical trees. **Second Annual Report to the European Commission**. 1997.

HAGLER, J.R.; MUELLER, S.; TEUBER, L.R.; MACHTLEY, S.A.; VAN DEYNZE, A. Foraging Range of Honey bees, *Apis mellifera*, in Alfalfa Seed Production Fields. **Journal of Insect Science** 11(144). 2011.

HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution; International Journal of Organic Evolution** 59(8): 1633-1638. 2005.

HOU M.; DU, G.Z.; ZHAO, Z.G. Development of genomic microsatellite markers for *Aconitum gymnantrum* (Ranunculaceae) by next generation sequencing (NGS). **Molecular Biology Reports** 47: 727-729. 2020.

IBAMA (1992) **Portaria Ibama** nº 37-N, de 03 de abril de 1992 – Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008034139.pdf> Acesso em: 26 de nov. 2019.

JOMBART, T.; ALMED, I. Adegnet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. **Bioinformatics** 27(21): 3070-3071. 2011.

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** 16: 1099-1106. 2007.

LEITE, E.J. State-of-knowledge on *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. Perspectives in **Plant Ecology, Evolution and Systematics** 5: 63-77. 2002.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Molecular Biology and Evolution** 21: 991-1007. 2004.

LU, Q.X.; GAO, J.; WU, J.J.; ZHOU X.; WU, X.; LI, M.D.; WEI, Y.K.; WANG, R.H.; QI, Z.C.; LI, P. Development of 19 novel microsatellite markers of lily-of-the-valley (*Convallaria*, Asparagaceae) from transcriptome sequencing. **Molecular Biology Reports** 47: 3041-3047. 2020.

MILLER, M.P.; KNAUS, B.J.; MULLINS, T.D.; HAIG, S.M. SSR_pipeline: A bioinformatic infrastructure for identifying microsatellites from paired-end Illumina high-throughput DNA sequencing data. **Journal of Heredity** 104: 881-885. 2013.

- MORAES, M.A.; KUBOTA, T.Y.K.; ROSSINI, B.C.; MARINO, C.L.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, M.L.T.; SILVA, A.M.; CAMBUIM, J.; SEBBENN, A.M. Long-distance pollen and seed dispersal and inbreeding depression in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) in the Brazilian savannah. **Ecology and Evolution** 8(16): 7800-7816. 2018.
- MRÁZEK, J.; GUO, X.; SHAH, A. Simple sequence repeats in prokaryotic genomes. **P. Natl. Acad. Sci. USA** 104: 8472-8477. 2007
- PEREIRA-NETO, L.G. *Astronium fraxinifolium* Schott seed longevity: physiological, biochemical and molecular studies. Thesis in Agronomy. Faculty of Agronomic Sciences, Paulista State University, Botucatu. 2016.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155(2): 945-959. 2000.
- SANCHEZ-GOMEZ, K.F.; CRISTÓBAL-PÉREZ, E.J.; HARVEY, N.; QUESADA, M. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Astronium graveolens* (Anacardiaceae) and cross amplification in related species. **Molecular Biology Reports** 47: 4003-4007. 2020.
- SARZI, D.S.; JUSTOLIN, B.; SILVA, C.D.; LEMOS, R.P.; STEFENON, V. Discovery and characterization of SSR markers in *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) using low coverage genome sequencing. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências** 91(1). 2019.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology** 18: 233-234. 2000.
- SOUZA, D.C.L.; ROSSINI, B.C.; SOUZA, F.B.; SEBBENN, A. M., MARINO, C. L., MORAES, M. L. T. Development of microsatellite markers for *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão), a highly endangered species from tropical forest based on next-generation sequencing. **Molecular Biology Reports** 45(1): 71-75. 2018.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes** 4: 535-538. 2004.
- ZHENG, X.; PAN, C.; DIAO, Y.; YOU, Y., YANG, C.; HU, Z Development of microsatellite markers by transcriptome sequencing in two species of *Amorphophallus* (Araceae). **BMC Genomics** 14(1): 490. 2013.
- ZHOU, T.; LI, Z.H.; BAI, G.Q.; FENG, L., CHEN, C., WEI, Y.; CHANG, Y.X.; ZHAO, G.F. Transcriptome Sequencing and Development of Genic SSR Markers of an Endangered Chinese Endemic Genus *Dipteronia Oliver* (Aceraceae). **Molecules** 21(3): 166. 2016.
- WANG, L.; GONG, X.; JIN, L.; LI, H.; LU, J.; DUAN, J.; MA, L. Development and validation of EST-SSR makers of *Magnolia wufengensis* using de novo transcriptome sequencing. **Trees**. 2019.
- WANG, P.; YANG, L.; ZHANG, E.; QIN, Z.; WANG, H.; LIAO, Y.; WANG, X.; GAO, L. Characterization and Development of EST-SSR Markers from a Cold-Stressed Transcriptome of Centipedegrass by Illumina Paired-End Sequencing. **Plant Molecular Biology Reporter** 35(2): 215. 2016.

YOU, F.M.; HUO, N.; GU, Y.; LUO, M.C.; MA, Y.; HANE, D.; LAZO, G.R.; DVORAK, J.; ANDERSON, O.D. BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design. **BMC Bioinformatics** 9(1): 253. 2008.

6. CAPÍTULO 3

DIVERSIDADE GENÉTICA E SISTEMA DE REPRODUÇÃO DE *Astronium fraxinifolium* Schott EM TESTE DE PROCEDÊNCIAS E PROGÊNIES

Astronium fraxinifolium Schott é uma espécie arbórea tipicamente encontrada no Cerrado e em biomas circundantes. Possui alta capacidade adaptativa de regeneração em áreas degradadas, restabelecendo a sucessão ecológica. Entretanto, há poucas informações sobre a diversidade genética de populações naturais no Brasil e ainda menos informações sobre o genoma desta espécie. Neste estudo caracterizaram-se as três gerações de duas procedências de *A. fraxinifolium* a fim de estimar parâmetros genéticos populacionais e de sistema de reprodução. Foram utilizados oito marcadores microssatélites para genotipar 21 indivíduos de uma população natural de Mato Grosso do Sul (MS) e 15 de São Paulo (SP), 24 matrizes de MS do teste de procedências e progênies (TPP) e 17 de SP e 580 regenerantes de MS do TPP e 476 de SP do TPP. Os regenerantes foram coletados no evento reprodutivo de 2017 (21 anos de idade). O número total de alelos (51 a 108) e valores de heterozigosidades altos ($>0,71$) observados demonstraram que estas populações conservam índices de diversidade genética consideravelmente altos. Os cruzamentos em sua maioria foram aleatórios, porém 20% dos indivíduos de MS e 11% de SP são irmãs-completas, sendo o coeficiente de coancestria dentro de progênies de 0,152 para MS e 0,142 para SP, valores superiores ao esperado em progênies de meias-irmãs (0,125). Visando à utilização dessas sementes para reflorestamentos para a garantir um tamanho efetivo de população de 150 será necessário coletar sementes de no mínimo 49 árvores matrizes. De um modo geral, a conservação *ex situ* foi suficiente para manter a diversidade genética das populações e conservá-las. Um manejo do teste é recomendado, a fim de evitar endogamia, mas este deve levar em consideração a proporção sexual dentro de família. Além disso, as informações obtidas são inéditas para a espécie e auxíla em planos de conservação e melhoramento genético, não somente para *A. fraxinifolium*, mas também para sementes produzidas em conservações *ex situ*.

Palavras-chave: Conservação genética; Genética de Populações; Gonçalves-alves; Microssatélites.

6.1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade global encontra-se ameaçada devido à erosão dos habitats naturais, que são convertidos muitas vezes em pequenos fragmentos isolados, ocasionando a redução dos níveis de diversidade genética e tamanho efetivo populacional. Neste sentido, medidas de conservação e uso sustentável são necessárias para se compreender tais efeitos e o impacto na sobrevivência das espécies.

Uma das espécies afetadas pelo desmatamento é *Astronium fraxinifolium* Schott, conhecida como gonçalo-alves, que é muito explorada devido à excelente qualidade de sua madeira (LORENZI, 1998; NETO, 2008). Atualmente poucos indivíduos da espécie são encontrados, ocorrendo em habitats totalmente degradados, fragmentos florestais ou às margens de rodovias (AGUIAR et al., 2001). A espécie é dioica, pertencente à família Anacardiaceae, de polinização entomófila (ALLEM, 1991) e dispersão anemocórica (REYS et al., 2005). Trata-se de uma planta pioneira, heliófita, semidecídua e ocorre naturalmente na região de transição de Floresta Estacional Semidecidual e o Cerrado (LORENZI, 1998; AGUIAR, 2001), onde forma agrupamentos descontínuos (LORENZI, 2014).

Leite (2002) recomenda que áreas de conservação *in situ* ou para planejamento *ex situ* sejam realizadas, principalmente em regiões em que *A. fraxinifolium* não esteja conservada. Portanto, informações com base em dados genético-moleculares podem ser utilizados para estabelecer estratégias de conservação *in situ* e *ex situ* e definir populações prioritárias para conservação (DINIZ-FILHO; TELLES 2002, DINIZ-FILHO et al. 2012).

Neste trabalho foi realizada a caracterização genética de progênies de *A. fraxinifolium* provenientes de um teste de procedências e progênies por meio de marcadores microssatélites (CORNACINI et al., 2021), fornecendo informações sobre a diversidade genética produzida em conservações *ex situ* de espécies florestais, além de uma visão geral dos mecanismos de reprodução até então inéditas para a espécie.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Material

6.2.1.1 Histórico da área

No ano de 1995 trinta árvores matrizes de *A. fraxinifolium* foram amostradas às margens da rodovia BR-158 no estado de Mato Grosso do Sul (MS), no bioma do Cerrado brasileiro e trinta árvores matrizes localizadas às margens de duas rodovias, SP-595 e SP-310, no estado de São Paulo (SP), no bioma Mata Atlântica (Figura 1), foram evitadas a coleta de árvores próximas sempre que possível. No ano de 2017, para realização desse estudo, voltou-se ao local para coleta das folhas dessas árvores. Infelizmente, algumas matrizes haviam sido cortadas e já não existiam mais (Figura 2). Portanto, de 30 matrizes originais da população de MS foram coletadas folhas de 21 matrizes e de 30 matrizes originais da população de SP foram coletadas folhas de 15 matrizes (Figura 3).

Figura 1. Imagem via satélite da localização das matrizes de *Astronium fraxinifolium* coletadas em 1995 às margens da rodovia BR-158 no estado de Mato Grosso do Sul (MS), e às margens de duas rodovias, SP-595 e SP-310 no estado de São Paulo (SP).



Fonte: Imagem digital 2021, dados cartográficos 2021 Google, Inav/Geosistemas SRL.

Figura 2. Imagens da localização das matrizes de *Astronium fraxinifolium* em 2017 à margem da rodovia BR-158 no estado de Mato Grosso do Sul (MS). **A:** áreas com frequentes queimadas; e **B:** vegetação presente no local.



Fonte: própria autora

Figura 3. Coleta de folhas das matrizes de *Astronium fraxinifolium* em 2017 à margem da rodovia BR-158 no estado de Mato Grosso do Sul (MS). **A:** matriz isolada em pastagem à margem da rodovia. **B:** coleta de folhas de matriz em vegetação fragmentada à margem da rodovia.



Fonte: própria autora

6.2.1.2 Coleta e implantação do teste

No ano de 1996 foi instalado o teste de procedências e progênies de *A. fraxinifolium*. O desenho experimental foi de blocos completos casualizados, com 60 tratamentos (progênies), em que 30 são da procedência de MS e 30 são da procedência de SP, e 5 repetições. As parcelas do experimento obedecem a uma disposição linear, com 10 plantas por parcela, no espaçamento $3\text{ m} \times 3\text{ m}$ entre as árvores de *A. fraxinifolium* e de $3\text{ m} \times 1,5\text{ m}$ em plantio alternado com *Jacaranda cuspidifolia*. O experimento é conduzido em condições de campo na Fazenda de Ensino e Pesquisa da FEIS/Unesp, situada à margem direita do rio Paraná, no município de Selvíria-MS, a qual está localizada nas coordenadas geográficas $20^{\circ}20'08,64''\text{S}$, $051^{\circ}24'16,04''\text{W}$ e 378 metros de altitude (Figura 4).

Em 2017, quando o teste de procedência e de progênie *A. fraxinifolium* completou 21 anos, foi realizado um levantamento das árvores femininas e masculinas que estavam florescendo. Por ser uma espécie dioica, foram selecionadas no campo somente as matrizes femininas para coleta de frutos e folhas, sendo priorizado uma árvore feminina de cada progênie, totalizando 24 árvores matrizes de MS e 17 árvores matrizes de SP (Figura 5).

Figura 4. Imagem via satélite dos testes de procedência e progênies de *Astronium fraxinifolium*.



Fonte: Imagem digital 2021, dados cartográficos 2021 Google, Inav/Geosistemas SRL.

Figura 5. Coleta dos frutos no teste de procedências e progênes de *Astronium fraxinifolium* em Selvíria-MS, no ano de 2017.



Fonte: própria autora

6.2.1.3 Regenerantes

Das matrizes selecionadas do teste de procedências e progênes de *A. fraxinifolium* em Selvíria-MS foram coletados frutos. Os frutos foram armazenados em saco de papel e após a secagem natural foi realizado o beneficiamento (Figura 6).

Figura 6. Imagem do beneficiamento dos frutos de *A. fraxinifolium* em Selvíria-MS, no ano de 2017.



Fonte: própria autora

As sementes foram semeadas em sacos de polietileno (16 cm x 24 cm) contendo substrato, na proporção de três medidas de terra preta para uma de esterco bovino curtido. Para cada matriz foram semeadas de três a quatro sementes em 30 sacos distribuídos em três fileiras para cada matriz. O crescimento das mudas foi monitorado durante os dois primeiros meses após a semeadura, bem como o ataque de pragas. Após esse período foi realizado um raleio das mudas, permanecendo somente uma muda por recipiente (Figura 7).

Figura 7. Local de semeadura das progênies de *Astronium fraxinifolium* em Selvíria-MS, no ano de 2017. **A** – Sacos de polietileno sendo preparados e organizados. **B** – Semeadura das sementes. **C** – Irrigação da área. **D** – Mudas com dois meses após a semeadura.



Fonte: própria autora

Aos cinco meses, as mudas foram identificadas para, posteriormente, efetuar o plantio em campo e foram coletadas as folhas para realizar a extração de DNA. As folhas coletadas foram armazenadas em sacos de papel e acondicionadas em vasilhames de plástico com sílica. Nem todas as sementes germinaram, totalizando ao final 580 indivíduos da procedência de MS e 476 indivíduos da procedência de SP (Figura 8).

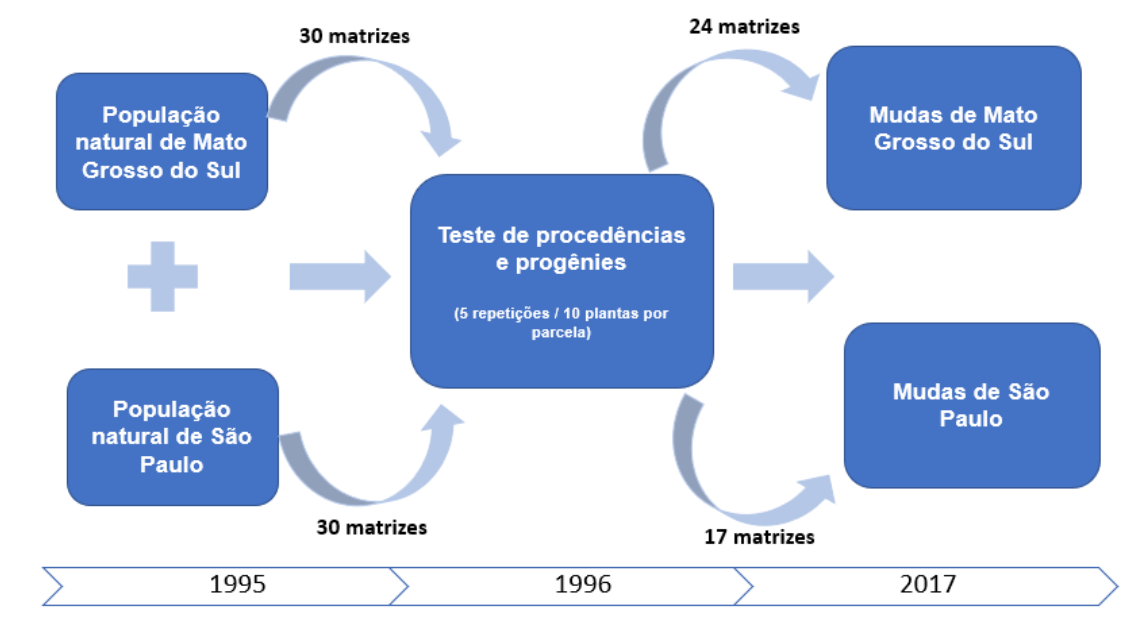
Figura 8. Progênes de *Astronium fraxinifolium* em Selvíria-MS, no ano de 2017. **A** – Identificação das mudas. **B** – Coleta das folhas para extração de DNA. **C** – Armazenamento das folhas em sacos de papel. **D** – Armazenamento das folhas em vasilhames de plástico com sílica.



Fonte: própria autora

Portanto, a amostragem foi realizada em três gerações de populações de *A. fraxinifolium* (Figura 9):

Figura 9. Representação esquemática das populações estudadas de *Astronium fraxinifolium*.



6.2.2 Métodos

6.2.2.1 Extração e amplificação do DNA e genotipagem dos indivíduos

O DNA genômico foi extraído de folhas, empregando-se o método descrito por Doyle e Doyle (1990), seguindo o protocolo de Faleiro et al (2003), com modificações, quantificados em NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Products, DE, USA) e verificada sua integridade em géis de agarose 1%, em corrida com TBE (1x), com tensão constante de 120 V.

Foram utilizados oito pares de *primers* microssatélites (SSRs) espécie-específicos descritos por Cornacini et al. (2021) (Tabela 1). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com a adição de uma cauda M13 para marcação fluorescente (SCHUELKE, 2000). A mistura para a reação continha 5,0 µL de GoTaq Incolor Master Mix, 0,3 µL de *primer* senso (2 pmol), 0,3 µL de *primer* antisenso (8 pmol) 0,3 µL de *primer* fluorescente com M13 (Tabela 1), 0,5 µL de albumina de soro bovino (BSA, 0,1 mg/ml da Promega Corporation), 1,0 µL de DNA genômico (aproximadamente 50 ng) e água sem nuclease para completar um volume de reação final de 10 µL. O programa de PCR foi: 5 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C; uma temperatura de anelamento específica do *primer* por 1 min 30s; 72°C durante 1 min; seguido por 12 ciclos de 94°C por 30s; 53 ° C por 1 min 30s; 72°C durante 1 min; e uma extensão final a 72°C por 20 min.

Os produtos de PCR foram genotipados no sequenciador ABI3130xl (Applied Biosystems) com GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems). Os genótipos foram atribuídos usando o *software* GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

Tabela 1. Marcadores microssatélites para *Astronium fraxinifolium*, pares de *primers* incluem sequências *forward* e *reverse*, elementos repetidos, tamanho do alelo em pares de bases (pb), temperatura de anelamento (°C) e cauda fluorescente de M13.

<i>Locus</i>	Sequência do primer 5' - 3'	Elementos repetidos	Tamanho (pb)	Temperatura (°C)	M13
<i>GA_02</i>	F: TCTCCCCTCTACCTGCACTC R: ATCACCTTCTCCCACGAAGA	(CT) ₁₂	92 - 118	54	PET
<i>GA_03</i>	F: CAAGAACGAAAGAAGATCAACC R: ATGCTGATGGATCGATTGTG	(TA) ₂₄	84 - 100	54	NED
<i>GA_04</i>	F: AAACAAACATGATGCCAGGA R: CACTTCAATCCAGGGAAAAGA	(AG) ₂₀	120 - 142	54	VIC
<i>GA_05</i>	F: CATCGATGATGAACCCAGAA R: CTCTACGGAAGCGGAGTCAC	(TC) ₁₂	250 - 260	54	FAM
<i>GA_06</i>	F: CGGCGCAAATAGTTAATAGGA R: TGATCTACAGCCCATCCTGA	(AG) ₁₃	104 - 138	54	PET
<i>GA_07</i>	F: GATGGTAGAGGCTGGTGTGTTG R: CCAAGCTCATTTCCGTCATC	(AG) ₁₀	123 - 139	54	NED
<i>GA_08</i>	F: GAAAGAGAAAGAGATCGGAACG R: CATCACCACCCACCAAACCTC	(GA) ₃₇	105 - 121	54	VIC
<i>GA_09</i>	F: GCCCAGATTCTCTCAATCTCC R: CGCGTTCTTTGTAGCAGACA	(CT) ₂₄	73 - 123	54	FAM

6.2.2.2 Análise dos dados

a) Diversidade genética

O número de alelos por loco (A), a heterozigosidade observada (H_o) e a heterozigosidade esperada (H_e) foram estimados para cada loco pressupondo que os locos estejam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). A significância de $\hat{F}$ foi obtida por permutação de alelos entre indivíduos. A partir das frequências alélicas (f) foram determinados os alelos raros ($f < 0,05$) e alelos privados. Para medir a divergência genética interpopulacional foi utilizado o índice padronizado $\hat{G}_{ST}$ de acordo com Hedrick (2005). Os parâmetros estimados e utilizados para o cálculo de $\hat{G}_{ST}$ foram obtidos usando o programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995).

b) Sistema de reprodução

O Sistema de reprodução foi caracterizado pelo modelo misto de reprodução (RITLAND; JAIN, 1981) e cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989), por meio do *software* MLTR v.2.4 (RITLAND, 2002). As análises foram realizadas em nível de população e o intervalo de confiança foi estimado a 95%, por meio de 1.000

reamostragens *bootstrap*. As unidades de reamostragens foram as progênies e as frequências do pólen. Os seguintes índices foram obtidos pelo programa ou estimados de acordo com as expressões:

i) Taxa de cruzamento multiloco ($\hat{t}_m$);

ii) Taxa de cruzamento uniloco ($\hat{t}_s$);

iii) Taxa de cruzamento entre parentes ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$);

iv) Correlação de autofecundação ($\hat{r}_s$);

v) Correlação multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$);

vi) Número médio de árvores polinizadoras $\hat{N}_{ep}$

$$\hat{N}_{ep} = 1 / \hat{r}_{p(m)} \text{ (RITLAND, 1989);}$$

vii) Coancestria média dentro de progênies em nível populacional $\hat{\Theta}$

$$\hat{\Theta} = 0,125(1 + \hat{F}_p) \left[4\hat{s} + (\hat{t}_m + \hat{s}\hat{r}_s\hat{t}_m)(1 + \hat{r}_p) \right] \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

em que: $\hat{S}$ é a taxa de autofecundação $\hat{S} = (1 - \hat{t}_m)$ e $\hat{F}_p$ é o índice de fixação da população parental.

viii) Tamanho efetivo de variância $\hat{N}_{e(v)}$ foi calculado com base em Cockerham (1969)

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0,5}{\hat{\Theta} \left(\frac{n-1}{n} \right) + \left(\frac{1 - \hat{F}_0}{2n} \right)} \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

em que: n é o tamanho amostral dentro das progênies $\hat{F}_0$ é o índice de fixação de progênies, obtido com base na frequência de pólen para calcular a heterozigosidade esperada $\left(\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2 \right)$, a fim de evitar erros devido a superestimativas das frequências alélicas para os alelos maternos. A heterozigosidade observada foi calculada por meio do índice de fixação obtido no FSTAT para então recalculer $\hat{F}_0 \left(1 - \left(\hat{H}_0 / \hat{H}_e \right) \right)$. A expressão de coancestria ($\hat{\Theta}$) utilizada está descrita no item (vii).

ix) Número de árvores matrizes para coleta de sementes ($\hat{m}$);

$$\hat{m} = \frac{\hat{N}_{e(referência)}}{\hat{N}_{e(v)}} \text{ (SEBBENN, 2002)}$$

assumindo reter na amostra total o tamanho efetivo de referência ($\hat{N}_{e(referência)}$) de 150;

x) Proporção de progênies de irmãs de autofecundação ($\hat{P}_{IA}$)

$$\hat{P}_{IA} = \hat{s}^2 \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

xi) Proporção de progênies de irmãs de autofecundação e cruzamento ($\hat{P}_{AC}$)

$$\hat{P}_{AC} = 2\hat{s}\hat{t}_m \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

xii) Proporção de progênies de meias-irmãs ($\hat{P}_{MI}$)

$$\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m^2(1 - \hat{r}_p) \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

xiii) Proporção de progênies de irmãs completas ($\hat{P}_{IC}$)

$$\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m^2\hat{r}_p \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Diversidade genética

Foi genotipado um total de 1.097 indivíduos para oito locos microssatélites, sendo que o número total de alelos encontrados variou de 57 a 103 para MS e de 51 a 108 para SP. Apesar de menos indivíduos amostrados das populações naturais, o número de alelos encontrados foi relativamente alto e, por um nível amostral maior dos regenerantes, foi possível detectar um maior número de alelos. A média do número de alelos por loco variou de 7 a 12,5 para MS e 5 a 13 para SP.

A heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,719 a 0,781 e a heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,699 a 0,848. Nas duas populações naturais, MS e SP, a H_e foi maior que a H_o , o mesmo não ocorreu nos regenerantes, em que a H_o foi maior que a H_e .

Excesso de heteroziguidade também foi evidenciado para outras espécies dioicas, *Genipa americana* (MELO et al., 2021) e *Myracrodruon urundeuva* (ZULIAN et al., 2021).

O índice de fixação ($\hat{F}$, Tabela 2) não foi significativo para as populações adultas. Para os locos SSR das duas procedências dos regenerantes foram detectados valores positivos e negativos para o $\hat{F}$, alguns significativos para excesso de homozigotos e outros para excesso de heterozigotos. Portanto, resultou para as duas procedências médias dos valores de $\hat{F}$ não significativas, indicando ausência de endogamia. Resultados semelhantes foram encontrado por Zulian et al. (2021) em um pomar de sementes por muda de *M. urundeuva*, espécie dioica, o que indica ótima qualidade genética da semente.

Apesar das populações estarem em rodovias com alta fragmentação e interferência antrópica, o teste de procedências e progênies, assim como seus regenerantes conservaram os índices de diversidade genética, o número de alelos e a riqueza alélica. Como salienta Vencovsky (1988), reunir procedências diferentes é importante para a conservação genética e significa aumentar o tamanho efetivo populacional (N_e) e a variabilidade genética. Fica evidente a importância e efetividade da conservação *ex situ* bem delineada, garantindo assim a manutenção da diversidade das populações de espécies locais.

Tabela 2. Diversidade genética, índice de fixação em locos microssatélites de árvores adultas, de população natural e de teste de progênies, e progênies de *Astronium fraxinifolium* de MS e SP. N é o tamanho amostral; k é o número total de alelos; R é a riqueza alélica para os indivíduos genotipados nos oito locos microssatélites; H_o é a heterozigosidade observada; H_e é a heterozigosidade esperada e F é o índice de fixação.

MS	Adultos (Matrizes da população natural)						Adultos (Matrizes do Teste de progênies)						Progênies (Mudas do teste de progênies)					
Loco	N	k	R	H_o	H_e	F	N	k	R	H_o	H_e	F	N	k	R	H_o	H_e	F
Ga02	21	10	9.676	0.714	0.860	0.169	23	10	10	1.000	0.872	-0.147	550	14	13.972	0.936	0.853	-0.098*
Ga03	21	9	8.284	0.332	0.701	0.525	23	3	3	0.783	0.610	-0.284	564	8	8.000	0.905	0.658	-0.376*
Ga04	21	8	7.976	0.428	0.836	0.487	23	13	13	0.783	0.784	0.001	563	19	18.950	0.910	0.852	-0.069*
Ga05	18	8	8.000	0.389	0.750	0.481	23	4	4	0.565	0.682	0.171	535	12	12.000	0.424	0.693	0.388*
Ga06	18	9	9.000	0.721	0.763	0.054	23	3	3	0.652	0.640	-0.019	575	11	10.791	0.568	0.650	0.126*
Ga07	19	8	7.788	0.684	0.727	0.058	23	6	6	0.913	0.770	-0.186	542	12	11.987	0.885	0.782	-0.132*
Ga08	19	7	6.842	0.789	0.750	-0.053	23	8	8	0.913	0.860	-0.062	564	14	13.946	0.685	0.851	0.194*
Ga09	21	9	8.838	0.714	0.887	0.195	23	10	10	0.956	0.828	-0.155	544	13	13.000	0.773	0.780	0.008
Média	20	8.5	8.000	0.699	0.756	0.182	23	7	7	0.848	0.777	-0.104	556.5	12.5	12.500	0.829	0.781	-0.030
DP	1.388	0.925	1.000	0.172	0.063	0.227	0	3.720	3.720	0.153	0.100	0.139	13.835	3.136	3.137	0.187	0.087	0.232
Total	-	68	-	-	-	-	-	57	-	-	-	-	-	103	-	-	-	-

SP	Adultos (Matrizes da população natural)						Adultos (Matrizes do Teste de progênies)						Progênies (Mudas do teste de progênies)					
Loco	N	k	R	H_o	H_e	F	N	k	R	H_o	H_e	F	N	k	R	H_o	H_e	F
Ga02	15	5	5	0.933	0.586	-0.593	17	7	7	0.881	0.847	-0.041	422	12	12.000	0.810	0.846	0.042
Ga03	15	5	5	0.733	0.636	-0.154	17	6	6	0.705	0.691	-0.021	419	13	13.000	0.778	0.706	-0.102*
Ga04	15	9	9	0.666	0.869	0.233	17	11	11	0.940	0.858	-0.096	429	21	20.953	0.888	0.867	-0.025
Ga05	15	4	4	0.333	0.729	0.542	17	4	4	0.588	0.660	0.109	435	11	10.890	0.429	0.686	0.374*
Ga06	15	6	6	0.666	0.700	0.048	17	4	4	0.470	0.689	0.317	440	9	8.898	0.581	0.660	0.119*
Ga07	15	6	6	0.933	0.757	-0.233	17	6	6	0.705	0.708	0.003	446	14	13.875	0.831	0.712	-0.168*
Ga08	15	8	8	0.866	0.888	0.024	17	5	5	0.941	0.730	-0.290	440	15	14.898	0.880	0.793	-0.110*
Ga09	15	9	9	0.533	0.800	0.333	17	8	8	0.823	0.798	-0.032	427	13	12.981	0.754	0.811	0.070*
Média	15	5	5	0.700	0.743	0.036	17	6	6	0.764	0.719	-0.026	432	13	12.990	0.794	0.752	0.008
DP	-	2	2	0.207	0.105	0.355	-	2.326	2.326	0.170	0.076	0.172	9.528	3.545	3.553	0.159	0.078	0.171
Total	-	52	-	-	-	-	-	51	-	-	-	-	-	108	-	-	-	-

Quanto aos alelos detectados, os de baixa frequência ($\leq 0,05$) representaram 24,3% para os regenerantes de MS e 25% para os de SP. Portanto, na área estudada verificou-se que 33,9% dos alelos encontrados são de baixa frequência, indicando um sinal de suscetibilidade da diversidade genética da espécie com a possível perda significativa de alelos (OLIVEIRA et al.; 2020). Ainda que as duas procedências (MS e SP) estejam plantadas no mesmo local, os regenerantes apresentaram 12,6% e 14,8%, respectivamente para MS e SP, de alelos privados (Tabela 3), o que pode indicar fluxo gênico restrito entre as procedências (SEOANE et al., 2000). Mas quando comparadas as frequências alélicas das duas procedências pela média do índice padronizado ($\hat{G}_{ST'}$), apresentaram média de $0,033 \pm 0,073$ para os regenerantes, portanto, apenas 3% da diversidade genética encontra-se distribuída entre as duas procedências, sendo a maior porção da diversidade genética dentro das procedências.

Tabela 3. Frequências alélicas dos locos microssatélites dos regenerantes *Astronium fraxinifolium*, para procedência MS e procedência SP.

Locos		MS	SP
N		550	422
GA02	100	0.043*	0.032*
	102	0.002*	0.002*
	104	0.152	0.146
	106	0.114	0.235
	108	0.049*	0.026*
	110	0.288*	0.21*
	112	0.065	0.123
	114	0.067	0.118
	116	0.076	0.023*
	118	0.08	0.033*
	120	0.057	0.049*
	122	0.003*	0.004*
	124	0.003* ^p	0
	126	0.001* ^p	0
N		564	419
GA03	82	0	0.018*
	84	0	0.001* ^p
	86	0.26	0.308
	88	0	0.005* ^p
	90	0.005*	0.041*
	92	0.496	0.428
	94	0.003*	0.004*
	96	0.074	0.094

	98	0.15	0.074
	100	0.006*	0.012*
	102	0.005*	0.005*
	104	0	0.007* ^p
	106	0	0.004* ^p
	N	563	429
GA04	108	0	0.001* ^p
	110	0.011*	0.014*
	112	0	0.008* ^p
	114	0.021*	0.015*
	116	0.028*	0.006*
	118	0.062	0.062
	120	0.048*	0.075
	122	0.04*	0.077
	124	0.003*	0.019*
	126	0.298	0.287
	128	0.112	0.085
	130	0.089	0.117
	132	0.161	0.111
	134	0.028*	0.009*
	136	0.008*	0.01*
	138	0.004*	0.027*
	140	0.053	0.019*
	142	0.003*	0.036*
	144	0.02*	0.02*
	146	0	0.001* ^p
	148	0.012*	0.002*
	152	0.001* ^p	0
	N	535	435
GA05	234	0.002* ^p	0
	238	0.003* ^p	0
	240	0.004* ^p	0
	242	0.011*	0.026*
	244	0.005*	0.011*
	246	0	0.003* ^p
	248	0.002*	0.001*
	250	0.006*	0.001*
	252	0.318	0.361
	254	0.406	0.391
	256	0.202	0.175
	258	0.036*	0.008
	260	0	0.021*
	262	0.007*	0.001*
	N	575	440
GA06	106	0.01*	0.002*
	108	0.31	0.251

	110	0.004*	0.002*
	116	0	0.001* ^p
	126	0.007*	0.04*
	128	0.001* ^p	0
	130	0.188	0.226
	132	0.468	0.474
	134	0.001*	0.002*
	136	0.001* ^p	0
	138	0.008*	0.001*
	140	0.003* ^p	0
	N	542	446
GA07	116	0	0.001* ^p
	120	0.002*	0.004*
	122	0.013*	0.034*
	124	0	0.008* ^p
	126	0.002*	0.002*
	128	0.168	0.102
	130	0.047*	0.003*
	132	0.056	0.016*
	134	0.006*	0.009*
	135	0	0.001* ^p
	136	0.351	0.46*
	138	0.184	0.143
	140	0.165	0.211
	142	0.005*	0.006*
	144	0.001* ^p	0
	N	564	440
GA08	92	0.001* ^p	0
	96	0.002*	0.005*
	98	0.003* ^p	0
	100	0.02*	0.024*
	102	0.176	0.007
	104	0.121	0.191
	105	0	0.001* ^p
	106	0.009*	0.007*
	108	0.141	0.12
	110	0.228	0.168
	112	0.06	0.032*
	114	0.081	0.093
	116	0.148	0.344
	118	0.007*	0.002*
	120	0.004*	0.002*
	122	0	0.001* ^p
	124	0	0.002* ^p
	N	544	427
GA09	100	0.005*	0.018*

102	0.005* ^p	0
104	0.092	0.069
106	0.009*	0.011*
108	0.187	0.18
110	0.018*	0.028*
112	0.39	0.321
114	0.121	0.178
116	0.054	0.029*
118	0.019*	0.015*
120	0.083	0.125
122	0.006*	0.009*
124	0.011*	0.015*
126	0	0.001* ^p

*alelos raros ($P < 0,05$); ^p alelos privados.

6.3.2 Sistema de reprodução

Como esperado para espécies dioicas, em que não há autofecundação, as estimativas da taxa de cruzamento multiloco (t_m) para as duas procedências foram próximas de um (0,99; Tabela 4), resultados semelhantes foram encontrados para outras espécies dioicas como a *Araucaria angustifolia* (SOUSA et al., 2005), *Bagassa guianensis* (SILVA et al. 2008), *Cecropia pachystachya* (KAGEYAMA et al., 2003), *Genipa americana* (SEBBENN et al. 1998; MELO et al., 2021), *Ilex paraguariensis* (WENDT et al. 2009) e *Myracrodruon urundeuva* (MORAES et al. 2004; GAINO et al., 2011), taxas multilocos e unilocos diferentes da unidade para espécies dioicas são atribuídas aos cruzamentos entre indivíduos aparentados (WENDT et al., 2009). Neste estudo a diferença entre a taxa de cruzamento multilocos e unilocos foi maior que zero ($\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,085$ (SP) e $0,151$ (MS)), indicando a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos que são parentes.

Como os regenerantes são de um teste de procedências e progênes, eram esperados cruzamentos correlacionados (irmãs-completas). A proporção de indivíduos desses cruzamentos foi de 11% ($\hat{R}_{p(m)}=0,111$) para SP e 20% para MS ($\hat{R}_{p(m)}=0,205$), indicando que essas árvores são parentes no grau de irmãs-completas. A proporção foi maior para a procedência de MS, assim como a proporção de florescimento (Capítulo 1), nesse sentido é preciso ter atenção ao manejo do teste para evitar endogamia, pois ainda que o aumento de indivíduos florescendo possibilite o aumento de combinações, essas podem ocorrer entre indivíduos correlacionados. Como salienta Wendt et al. (2009), em

pomares de sementes, é desejável evitar qualquer nível de endogamia, sendo necessária a eliminação dos indivíduos parentes de sexos opostos do pomar para evitar obter sementes que possam expressar algum grau de depressão endogâmica.

Apesar da procedência de MS apresentar maior porcentagem de indivíduos no grau de irmãs-completas, foi a procedência de SP que apresentou maior Índice de fixação ($\hat{F}_p = 0,219$ e $\hat{F}_o = 0,187$). Segundo Manoel et al. (2021), alelos fixados em uma dada população, apesar de resultarem em depressão por endogamia, podem também ser alelos favoráveis, pois podem estar ocorrendo mecanismos de adaptação genética que possibilitem o estabelecimento e manutenção de populações como forma alternativa para a espécie sobreviver a novas condições locais.

O coeficiente médio de coancestria (Θ) foi superior ao esperado para progênes de meias-irmãs ($\Theta = 0,125$), 0,142 (SP) e 0,151 (MS), indicando outros níveis de parentesco. Segundo Silva et al. (2008), fenologias de floração assíncrona, baixo nível reprodutivo, tamanho da população e comportamento dos polinizadores que visitam a árvores vizinhas são as causas mais prováveis de cruzamentos correlacionados. Esses fatores que podem ficar acentuados em um teste de procedências e progênes, em que a área é limitada e a densidade de árvores irmãs é maior. Ainda assim, a Θ não diferiu de estudos realizados em regenerantes de populações naturais para espécies dioicas (SOUSA et al., 2005; SILVA et al. 2008; GAINO et al., 2011; MELO et al., 2021), indicando uma alta frequência de acasalamento aleatório.

Segundo Manoel et al. (2021), a distância de dispersão do pólen para *A. fraxinifolium* é em média de 185 m, nesse sentido acasalamentos não correlacionados podem ser evitados também por meio da disposição das árvores no plantio. No TPP os indivíduos de *A. fraxinifolium* estão alternados com *Jacaranda cuspidifolia* e as cinco repetições das procedências de MS e SP estão intercaladas, promovendo uma distância maior de indivíduos irmãos. O TPP possui comprimento de aproximadamente 500 m e largura de 75 m, resultando em uma área de 30.000 m², portanto a polinização, apesar da possibilidade de ficar restrita às árvores do TPP, pode ocorrer entre indivíduos não aparentados.

O tamanho efetivo da variância ($\hat{N}_{e(v)}$) é um importante parâmetro para determinar os tamanhos de amostra necessárias para conservação de genes *ex situ* e coleta de sementes para restaurar populações degradadas. Também é importante para monitorar o tamanho das populações selecionadas e prever o número de gerações em que uma

população pode ser submetida à seleção (SOUSA et al., 2005). Neste trabalho, o número efetivo de árvores polinizadoras ($\hat{N}_{ep}$) da procedência de SP (8) foi maior que para a procedência de MS (4,87), mostrando que mais árvores masculinas contribuíram na polinização das árvores de SP, ainda assim o tamanho efetivo de variância ($\hat{N}_{e(v)}$) foi semelhante para as duas procedências (3,168 – SP e 3,074 –MS), mas menor que de progênes de uma população idealizada (tamanho infinito, cruzamentos aleatórios, ausência de seleção, mutação e migração), que corresponde a quatro. Esses desvios causam reduções no tamanho efetivo de variância. Portanto, para manter um tamanho efetivo populacional de referência de 150 é necessário que a coleta de sementes seja realizada em no mínimo 47 árvores matrizes para SP e 49 para MS.

Além disso, se levado em consideração o florescimento do TPP-MS e do TPP-SP (Capítulo 2) e o $\hat{N}_{e(v)}$ foi verificada uma diferença com variação de 58 a 450 (Tabela 5) para o tamanho efetivo populacional calculado (Capítulo 2). Com o aumento de indivíduos em florescimento há o aumento das combinações alélicas possíveis para gerar descendentes. Portanto, o florescimento é fator importante a ser verificado, pois há grande variação de um evento reprodutivo para o outro, o que influencia diretamente no tamanho efetivo populacional da próxima geração.

Com base nos dados obtidos para *A. fraxinifolium*, sugere-se como estratégia de conservação genética para espécies arbóreas que: em populações naturais prioriza-se coleta de mais de 40 árvores matrizes, se possível respeitando distâncias mínimas entre as árvores, conforme a probabilidade de evitar a coleta de indivíduos endogâmicos, para *A. fraxinifolium* uma distâncias mínima de 180 m entre indivíduos de flores femininas. Para o plantio em conservação *ex situ* é recomendável evitar o plantio próximo de árvores meias-irmãs, o plantio pode ser misto e/ou com outras procedências. Para a coleta em plantios de conservação *ex situ* recomenda-se a coleta de no mínimo 47 árvores matrizes não-irmãs de uma população. Recomenda-se para o desenvolvimento e posterior plantio de pelo menos 20 mudas de cada árvore matriz. Em todas as etapas é necessário que se considere a razão sexual da população, adaptação e sobrevivência dos indivíduos na respectiva região.

O TPP se mostrou apto para fornecer sementes com qualidade genética de *A. fraxinifolium* visando reflorestamentos ou para um futuro programa de melhoramento. Além disso, as informações desse trabalho são relevantes e inéditas, pois é o primeiro estudo aplicando marcadores moleculares para análise de diversidade genética,

endogamia, tamanho efetivo e sistema reprodutivo em mudas advindas de uma conservação *ex situ* no delineamento de teste de procedências e progênies de *A. fraxinifolium*. Os resultados gerados contribuem para a elaboração das estratégias de conservação *ex situ* para espécies arbóreas nativas.

Tabela 4. Sistema de reprodução de regenerantes de um teste de procedências e progênies de *A. fraxinifolium*, em Selvíria-MS.

Parâmetro	SP	MS
Número árvores matrizes: n_m	18	23
Número descendentes: n_d	28,5 (10 – 30)	28 (13 – 30)
Índice de fixação da população parental: $\hat{F}_p$	0,219 (0,101 – 0,336) ^{IC}	-0,105 (-0,271 – 0,060) ^{IC}
Índice de fixação dentro de progênies: $\hat{F}_o$	0,187 (0,075 – 0,299) ^{IC}	0,011 (-0,238 – 0,260) ^{IC}
Índice de fixação em árvores-matriz: F_m	0.006 (0 – 0.005) ^{IC}	0
Taxa de cruzamento multiloco: t_m	0,999 (0,994-1) ^{IC}	0,998 (0,994-1) ^{IC}
Taxa de cruzamento uni-locos: t_s	0,914 (0,895-0,932) ^{IC}	0,847 (0,829-0,867) ^{IC}
Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m - t_s$	0, 085 (0,099-0,068) ^{IC}	0,151 (0,165-0,133) ^{IC}
Correlação de paternidade multiloco: $\hat{R}_{p(m)}$	0,111 (0,111-0,117) ^{IC}	0,205 (0,168-0,233) ^{IC}
Número efetivo de doadores de pólen: $\hat{N}_{ep}$	8 (10,638 – 6,578) ^{IC}	4,878 (5,952 – 4,292) ^{IC}
Coancestria dentro de progênies: $\hat{\theta}$	0,142 (0,138 – 0,145) ^{IC}	0,151 (0,147-0,154) ^{IC}
Proporção de irmãs de autofecundação: $\hat{P}_{IA}$	0	0
Proporção de irmãs de autofecundação e cruzamento: $\hat{P}_{AC}$	0,002 (0,012 – 0) ^{IC}	0,004 (0,012 – 0) ^{IC}
Proporção de meias-irmãs: $\hat{P}_{MI}$	0,873 (0,895 – 0,848) ^{IC}	0,792 (0,822 – 0,767) ^{IC}
Proporção de irmãs completas: $\hat{P}_{IC}$	0,125 (0,093 – 0,152) ^{IC}	0,204 (0,166 – 0,233) ^{IC}
Tamanho efetivo de variância: $\hat{N}_e$	3,168 (3,072 – 3,280) ^{IC}	3,074 (2,953-3,217) ^{IC}
Número de árvores matrizes para a coleta de sementes: m ($N_e=150$)	47,351 (45,733 – 48,824) ^{IC}	49 (47-51) ^{IC}

^{IC}Intervalo de confiança a 95% de probabilidade, ambos estimados por 1.000 reamostragens *bootstraps*.

Tabela 5. Quantidade de árvores de flores femininas (F) e masculinas (M), razão sexual (r), proporção sexual (F:M), tamanho efetivo de variância de F ($\hat{N}_{e(v)}$ F) e tamanho efetivo populacional ($N_{e(p)}$) em cinco eventos reprodutivos de *Astronium fraxinifolium* para procedência de Selvíria-MS e Ilha Solteira-SP, em Selvíria-MS.

Procedência	Eventos	2014	2017	2018	2019	2020
MS	M	136	221	289	225	261
	F	58	111	252	199	179
	r	0,299	0,334	0,465	0,469	0,406
	F:M	1:2	1:2	1:1	1:1	1:1
	$\hat{N}_{e(v)}$ (3,074) F	178	341	775	612	550
	$N_{e(p)}$	76	146	305	225	227
	$\hat{N}_{e(v)} - N_{e(p)}$	102	195	470	387	323
	Combinações possíveis	7.888	24.531	72.828	44.775	46.719
SP	M	92	117	195	156	159
	F	33	71	140	129	96
	r	0,264	0,377	0,417	0,452	0,376
	F:M	1:3	1:2	1:1	1:1	1:2
	$\hat{N}_{e(v)}$ (3,168) F	105	225	444	409	304
	$N_{e(p)}$	46	83	168	142	119
	$\hat{N}_{e(v)} - N_{e(p)}$	58	142	275	266	185
	Combinações possíveis	3.036	8.307	27.300	20.124	15.264

6.4 CONCLUSÃO

A utilização dos oito locos microssatélites é eficiente para determinar os parâmetros populacionais.

O alto número de alelos encontrados, endogamia não significativa e alta taxa de heterogossidade indicam que a diversidade das populações foi conservada e a sementes são de qualidade genética para serem utilizadas em programas de conservação e melhoramento.

Necessita-se coletar um mínimo de 47 e 49 árvores matrizes, para a população de SP e MS, respectivamente, de forma a manter um tamanho efetivo de referência de 150 para essas populações.

A reprodução ocorre por cruzamentos, sendo parte entre indivíduos parentes, parte correlacionados e a maior parte são aleatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEM, A. C. **Estudo da biologia reprodutiva de duas espécies florestais (aroeira e gonçalo-alves) da região do cerrado**. Brasília, DF: Embrapa/CENARGEN, 1991. p. 1-5.
- AGUIAR, A.V. **Variação genética em progênes de *Astronium fraxinifolium* Schott e *Jacaranda cuspidifolia* Mart. em consorcio**. 2001. 126 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2001.
- COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v. 23, p.72-84, 1969.
- CORNACINI, M.R.; MANOEL, R.O.; ALCANTARA, M.A.; MORAES, M.L.; SILVA, E.A.; NETO, L.G.P.; SEBBENN, A.M.; ROSSINI, B.C.; MARINO, C.L. Detection and application of novel SSR markers from transcriptome data for *Astronium fraxinifolium* Schott, a threatened Brazilian tree species. **Molecular Biology Reports**, 48(4), 3165-3172. 2021.
- DINIZ-FILHO, J.A.F.; BINI, L.M.; RANGEL, T.F.; MORALES-CASTILLA, I.; OLALLA-TÁRRAGA, M.Á.; RODRÍGUEZ, M.Á.; HAWKINS, B.A. On the selection of phylogenetic eigenvectors for ecological analyses. **Ecography**, 35(3), 239-249. 2012.
- DINIZ-FILHO, J.A.F.; TELLES, M.P.C. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation biology**, 16(4), 924-935. 2002.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12(13), 39-40. 1990.
- 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 a análises moleculares. **Embrapa Cerrados-Comunicado Técnico** (INFOTECA-E). 2003.
- GAINO, A.P.S.C.; MORAES, M.L.T.D.; MOREIRA, J.P.; CARDIN, L.T.; MORAES, M.A.; SILVA, A.M.D.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A. M. Mating system in *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae): implications for conservation genetics. **Brazilian Journal of Botany**, 34, 545-551. 2011.
- GOUDET, J. Fstat 2.9.3.2, 2002 URL: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 59(8): 1633-1638. 2005.
- KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L.A.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M.B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, 64, 93-107. 2003.
- LEITE, E.J. State-of-knowledge on *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics** Vol. 5/1, pp. 63–77. 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 6. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014. v. 1.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v.2, 352p.

MANOEL, R. O.; ROSSINI, B. C.; CORNACINI, M. R.; MORAES, M. L., CAMBUIM, J.; ALCÂNTARA, M. A.; SILVA, A.M.; SEBBENN, A. M.; MARINO, C. L. Landscape barriers to pollen and seed flow in the dioecious tropical tree *Astronium fraxinifolium* in Brazilian savannah. **PloS one**, 16(8), e0255275. 2021.

MELO, M.; SEBBENN, A.; ROSSINI, B.; MUNIZ, A.; RODRIGUES, C.; MARINO, C.; MORAES, M. Estimating genetic diversity, mating system and pollen dispersal to inform ex situ conservation of the tree *Genipa americana* L. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, 19(1), 9-19. 2021.

MORAES, M.L.T.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Correlated mating in dioecious tropical tree species, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Forest Genetics** 11: 53-59. 2004.

NETO, S.P.M. **Árvores nativas do cerrado com potencial madeireiro**. 2008. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

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.

REYS, P.; GALETTI, M.; MORELLATO, P. C. L.; SABINO, J. Fenologia reprodutiva e disponibilidade de frutos de espécies arbóreas em mata ciliar no rio Formoso, Mato Grosso do Sul. **Biota Neotropical**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 309-318, 2005.

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

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent locos. **Heredity**, London, v.88, n.4, p.221-228, 2002.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequency using n independent locos. **Heredity**, London, v.47, n.1, p.35-52, 1981.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology** 18:233-234, 2000.

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

SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. *In*:

HIGA, A. R.; SILVA, L. D. **Pomares de sementes de espécies florestais nativas.** Curitiba: FUPEF, 2006. p. 93–138.

SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Forestalis** 53: 15-30. 1998.

SEOANE, C.E.S.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Efeitos da fragmentação florestal em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.57, p.123-139, 2000.

SILVA, M.B.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; TOMPSON, I.; SEBBENN, A.M. Genetic effects of selective logging and pollen gene flow in a low-density population of the dioecious tropical tree *Bagassa guianensis* in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management** 255:1548-1558. 2008.

SOUSA, V.A.; SEBBENN, A.M.; HATTEMER, H.; ZIEHE, M Correlated mating in populations of a dioecious Brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Forest Genetics** 12: 107-119. 2005.

SOUZA, D.C.L.; ROSSINI, B.C.; SOUZA, F.B.; SEBBENN, A.M.; MARINO, C.L.; MORAES, M.L.T. Development of microsatellite markers for *Myracrodruon urundeuva* (FF & MF Allemão), a highly endangered species from tropical forest based on next-generation sequencing. **Molecular biology reports**, 45(1), 71-75. 2018.

VENCOSKY, R. Preservação e genética de populações. In: **ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS**, 1988. Jaboticabal. Anais. Jaboticabal: FCAVJ/UNESP. 1988, p.67-74.

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

ZULIAN, D.F.; CAMBUIM, J.; SAUL, F.A.C.; RIVA, L.C.; ALVES, P.F.; MORAES, M.A.; CORNACINI, M.R.; MARINO, C.L.; ROSSINI, B.C.; MORAES, M.L.T. Produção de sementes melhoradas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Alemão). In: Evangelista, W.V. **Produtos Florestais Não Madeireiros: tecnologia, mercado, pesquisas e atualidades.** Guarujá, SP: Científica Digital [livro eletrônico]. 2021.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tese desenvolvida apresenta grande contribuição para a sociedade, colaborando com a pesquisa e estabelecimento de estratégias de conservação de espécies arbóreas nativas. Apresentamos informações inéditas para *A. fraxinifolium*, espécie arbórea ameaçada de extinção no Brasil, tipicamente encontrada no Cerrado e em biomas circundantes, de alta capacidade adaptativa de regeneração em áreas degradadas e de importância econômica.

Considerando que no Brasil as formações florestais vêm sendo reduzidas a fragmentos cada vez menores, levando ao aumento da endogamia das populações e acarretando ainda a diminuição do valor adaptativo de uma espécie. Portanto, informações sobre espécies florestais nativas e de sementes com qualidade genética são fundamentais para fins de reflorestamento e recuperação ambiental. Apesar disso, informações sobre a diversidade genética e sobre o genoma ainda são escassas.

Nesse sentido, concluímos que *A. fraxinifolium* apresentou um padrão de florescimento anual para a espécie e foi observado o aumento do florescimento ao longo dos eventos reprodutivos em um teste de procedências e progênies. Razões sexuais próximas de 1:1 aumentam o tamanho efetivo e são ideais para conservação genética. Portanto, manejos considerando a proporção sexual são recomendados para evitar cruzamentos biparentais e manter a diversidade genética nas próximas gerações. Ainda assim, fenômenos ambientais devem ser acompanhados pois são fatores importantes para fenologia de espécies arbóreas que ocorrem no Cerrado, principalmente agora, devido às mudanças climática.

Apresentamos os primeiros marcadores SSR desenvolvidos para *A. fraxinifolium*, bem como sua frequência e distribuição com base nos dados de transcriptoma. Mais de 100 mil sequências apresentaram microssatélites, com distribuição predominante de repetições trinucleotídicas. Foram validados e avaliados 20 locos microssatélites, sendo todos polimórficos. Portanto, os locos SSR desenvolvidos a partir de dados de RNA-Seq foram adequados como ferramentas para estudos sobre diversidade genética e estrutura populacional, sistema de acasalamento e fluxo gênico para populações de *A. fraxinifolium* e espécies relacionadas.

Neste estudo, também caracterizamos três gerações de duas procedências de *A. fraxinifolium* a fim de estimar parâmetros genéticos populacionais por meio de oito marcadores microssatélites. O alto número de alelos encontrados, a endogamia não

significativa e alta taxa de heterogossidade indicam que a diversidade das populações foi conservada e as sementes são de qualidade genética para serem utilizadas em programas de conservação e melhoramento. Evidenciou-se a importância da conservação *ex situ* bem delineada, garantindo assim a manutenção da diversidade das populações de espécies locais.

Informações sobre o sistema reprodutivo para *A. fraxinifolium* também foram obtidas. Por meio de regenerantes de um TPP concluímos que a frequência de acasalamentos aleatórios foi maior (>75%) que cruzamentos entre indivíduos aparentados. O tamanho efetivo de variância foi semelhante para as duas procedências (3,168 – SP e 3,074 – MS) e indicou que para manter um tamanho efetivo populacional de referência de 150 será necessária coleta de sementes de no mínimo 47 árvores matrizes para SP e 49 para MS.

As informações desse trabalho são relevantes e inéditas, pois é o primeiro estudo aplicando marcadores moleculares para análise de diversidade genética, endogamia, tamanho efetivo e sistema reprodutivo em mudas advindas de uma conservação *ex situ* no delineamento de teste de procedências de progênies de *A. fraxinifolium*. Os resultados gerados contribuem para o desenvolvimento de estratégias de conservação *ex situ* para espécies arbóreas nativas.