

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

TÁBATA CAROLINE CERRI FRANÇA

**ANÁLISE DA ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Paratecoma peroba*
(Record) Kuhl. (BIGNONIACEAE), EM REMANESCENTES DE FLORESTA
ATLÂNTICA NA REGIÃO SUL DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

**ALEGRE, ES
AGOSTO - 2021**

TÁBATTA CAROLINE CERRI FRANÇA

**ANÁLISE DA ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Paratecoma peroba*
(Record) Kuhl. (BIGNONIACEAE), EM REMANESCENTES DE FLORESTA
ATLÂNTICA NA REGIÃO SUL DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como requisito do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda

Coorientadora: Profa. Dr^a. Karla Maria Pedra de Abreu

**ALEGRE, ES
AGOSTO - 2021**

AGRADECIMENTOS

A minha família, minha mãe Isabel Cristina Cerri e minha irmã Isabelle Cristine Cerri, por me apoiarem e acreditarem em mim, durante todo meu caminho percorrido. Por todo carinho e atenção oferecido nos momentos de dificuldade.

Ao meu namorado Lucas Moreira Xavier, por todo carinho, afeto, amor e motivação, que me foi oferecido nos momentos que mais precisei, também gostaria de citar o carinho e acolhimento que sua família proporcionou a mim.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar o curso, por todo apoio e ajuda.

Sou extremamente grata ao meu orientador Fabio Demolinari de Miranda por me permitir vivenciar essa experiência, amar a biologia molecular, e mesmo tão ocupado com os afazeres sempre estava à disposição, muito obrigada por tudo, foi um imenso prazer trabalharmos juntos!

Agradeço por ter conhecido o Adelson Lemes da Silva Júnior, pela parceria, dedicação e paciência para me ensinar, aprendi muito com você. Também gostaria de agradecer a Letícia Rigo Tavares e Lucas Batista Vargas, obrigada por tornarem as saídas de campo mais leves, divertidas e por me acompanharem no laboratório, obrigada pela amizade e companheirismo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do trabalho e concessão da bolsa.

Agradeço a todos os professores que tive durante a graduação e mestrado, sem vocês não estaria onde estou. Obrigada a todos que contribuíram de alguma forma para a concretização desta etapa. Minha sincera gratidão!

BIOGRAFIA

Tábatta Caroline Cerri França, filha de Isabel Cristina Cerri e Jose Velasco Gleidimar Velasco França, nasceu em Campo-Grande-MS em 11 de novembro de 1995.

Em 2015, ingressou como aluna de graduação na Universidade do Estado do Espírito Santo (UFES), em Alegre-ES onde obteve o título de Bacharelado em Ciências Biológicas em julho de 2019.

Em agosto de 2019, ingressou no mestrado do Programa de Pós- Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre-ES, na linha de pesquisa Biotecnologia sob orientação do Professor Fábio Demolinari de Miranda, submetendo-se à defesa de dissertação, em Julho de 2021.

RESUMO

Paratecoma peroba (Record) Kuhl, conhecida popularmente como peroba amarela é uma espécie arbórea, decídua, que se desenvolve em florestas estacionais da Mata Atlântica, podendo atingir 40 m de altura. Sua madeira foi considerada um produto comercial importante, sendo utilizada em construções, acabamentos e confecção de móveis de luxo. Devido ao potencial madeireiro, a espécie foi intensamente explorada, o que reduziu drasticamente os números de populações naturais. Em consequência dessa exploração e da devastação de seu bioma, a espécie atualmente está ameaçada de extinção. Nesse sentido, estudos baseados em parâmetros populacionais a partir de dados moleculares do DNA podem revelar informações sobre os níveis de diversidade genética, bem como os processos que a mantêm. Além disso, esses estudos podem contribuir para seleção de árvores matrizes, a fim de contribuir para planos de manejo e medidas de conservação. O objetivo desse estudo foi caracterizar a estrutura e diversidade genética de populações de *P. peroba* em remanescentes florestais na região sul do estado do Espírito Santo. Foram amostradas três populações de *P. peroba*, sendo elas: Polo de Educação Ambiental da Mata Atlântica (PEAMA); Floresta Nacional de Pacotuba (FLONA de Pacotuba); e Instituto Federal do Espírito Santo (IFES). Ao todo, obteve-se 116 indivíduos. Foram utilizados 10 *primers* ISSR, os quais revelaram a amplificação de 101 locos polimórficos. Foi encontrada alta diversidade genética, com número de alelos observados ($N_a = 1,99$) e alelos efetivos ($N_e = 1,49$). O índice de diversidade de Nei variou entre ($H' = 0,22$) e ($H' = 0,27$), e o índice de Shannon variou entre ($I = 0,33$) e ($I = 0,43$). A população do PEAMA apresentou os maiores índices de diversidade genética, enquanto a população do IFES apresentou os menores valores. A análise de variância molecular (Amova) revelou que a maior diversidade ocorreu dentro das populações (79,23%), o valor de Φ_{ST} das populações indicaram uma estrutura genética moderada. O fluxo gênico estimado para o conjunto das populações estudadas foi alto ($N_m = 7.0114$), contudo, a análise de estruturação genética indicou a presença de 3 grupos genéticos ($K = 3$). O marcador ISSR utilizado para avaliar populações da espécie *P. peroba* mostrou-se adequado para mensurar a diversidade genética, revelando que as populações do PEAMA e da FLONA de Pacotuba possuem indivíduos com variabilidade genética para seleção de árvores matrizes. Dessa forma, essas populações podem ser utilizadas para coleta de sementes e produção de mudas, sendo destinadas para projetos de recuperação ambiental e planos de manejo, a fim de contribuir com medidas de proteção e conservação da *P. peroba*.

Palavras Chaves: ISSR. Variabilidade Genética. Conservação. Peroba.

ABSTRACT

Paratecoma peroba (Record) Kuhl, popularly known as peroba amarela is a deciduous forest species found in seasonal forests of the Atlantic Forest, reaching up 40 m in height. Wood was considered an extremely important commercial product, being used in construction, finishing and for luxury furniture. Owing to the potential of the wood, an excessive wood exploration occurred, drastically reduced the numbers of natural populations. As a result of this exploration and the devastation of Atlantic Forest, the species is currently at risk of extinction. In this sense, studies based on population parameters based on molecular data obtained from DNA can reveal information about the levels of genetic diversity, as well as the processes that maintain it. Besides, these studies can contribute to the selection of mother trees in order to contribute to management plans and conservation measures. The present study aimed to characterize the structure and genetic diversity of *P. peroba* populations in forest remnants in the southern region of Espírito Santo state. Three populations of *P. peroba* were sampled: Polo de Educação Ambiental da Mata Atlântica (PEAMA); Floresta Nacional de Pacotuba (FLONA de Pacotuba); e Instituto Federal do Espírito Santo (IFES). In total, 116 individuals were obtained. Ten ISSR primers were used, which revealed the amplification of 101 polymorphic loci. High genetic diversity was found, with number of alleles observed ($N_a = 1.99$) and effective alleles ($N_e = 1.49$). Nei diversity index ranged between ($H' = 0.22$) and ($H' = 0.27$), and Shannon index ranged between ($I = 0.33$) and ($I = 0.43$). The population of PEAMA has the highest rates of genetic diversity, while a population of IFES has the lowest values. An analysis of molecular variance (Amova) revealed that the greatest diversity occurred within populations (79.23%), the Φ_{ST} value of the sources indicated a moderate genetic structure. The estimated gene flow for the set of populations studied was high ($N_m = 7,0114$), however, a genetic structure analysis indicated the presence of 3 genetic groups ($K = 3$). The ISSR marker used to evaluate populations of the *P. peroba* species proved to be adequate to measure genetic diversity, revealing that the populations of PEAMA and FLONA of Pacotuba have individuals with genetic variability for selection of mother trees. Thus, these populations can be used to collect seeds and produce seedlings, being destined for environmental recovery projects and management plans, in order to contribute with protection and conservation measures for *P. peroba*.

Key Words: ISSR. Genetic variability. Conservation. Peroba.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica de <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm. no Brasil.....	13
Figura 2. Hábito (A) e características do caule (B) de <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm.....	14
Figura 3. Folha (A), flor (B) e fruto (C) de <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm.....	15
Figura 4. Mapa de localização dos pontos de coletas, indicando as três populações de <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm. no sul do estado do Espírito Santo.....	24
Figura 5. Indivíduos de <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm. marcados nas três populações. A: PEAMA. B: FLONA de Pacotuba. C: IFES.....	25
Figura 6. Fotografia de gel de agarose 2% mostrando o perfil de fragmentos formado pelo <i>primer</i> UBC 807 (1-30) para a espécie <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm. (Ladder 100pb).....	31
Figura 7. Dendograma da dissimilaridade genética dos 116 indivíduos de <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm. utilizando o método UPGMA.....	34
Figura 8. Melhor valor de delta K obtido pelo software STRUCTURE.....	35
Figura 9. Representação gráfica obtida pela análise no software STRUCTURE, no qual cada grupo é representado por uma cor.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Populações de <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm. selecionadas no sul do estado do Espírito Santo.....	23
Tabela 2. Primers ISSR produzidos pela <i>University of British Columbia</i> e suas respectivas sequências testados em amostras de DNA de quatro indivíduos da espécie <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm.....	28
Tabela 3. Análise descritiva dos <i>primers</i> selecionados para <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm. número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por primer, faixa de variação de tamanho dos locos em pares de bases (TPB) e conteúdo da informação de polimorfismo (PIC).....	30
Tabela 4. Pares de genótipos que possuem valores extremos em maior e menor dissimilaridade (d) baseado na complementariedade do coeficiente de Jaccard, calculados a partir de 10 marcadores ISSR em 116 indivíduos de <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm. População 1= Peama; População 2= Flona, População 3= IFES.....	32
Tabela 5. Estimativa da diversidade genética das populações estudadas de <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm.....	38
Tabela 6. Análise da variância molecular (AMOVA) para as três populações de <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Taxonomia, distribuição geográfica e características morfológicas da espécie <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlmann.....	12
2.2. Marcadores moleculares.....	17
2.3. Marcador Molecular <i>Inter Simple Sequence Repeat</i> – ISSR.....	19
2.4. Diversidade e Estrutura Genética de Populações.....	20
2.5. A importância da manutenção da variabilidade e diversidade genética vegetal.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Área de Estudo.....	24
4.2. Amostragem e Coleta do Material Vegetal.....	25
4.3. Extração e Quantificação de DNA.....	26
4.4. Seleção e amplificação dos <i>primers</i> de ISSR.....	27
4.5. Análises Estatísticas.....	30
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Seleção do <i>Primer</i> ISSR.....	30
5.2. Estrutura e Diversidade Genética das Populações.....	33
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	42
Apêndice A.....	51

1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é considerada um dos biomas mais ricos em termos de diversidade do mundo, o que torna o processo de estudo genético de todas as espécies laborioso e, dessa forma, a preferência por apenas uma espécie como objeto de estudo torna-se mais adequada, revelando informações de níveis de diversidade, densidade populacional e características de reprodução (KAGEYAMA *et al.*, 2003).

Apesar da diversidade biológica encontrada na Mata Atlântica, essas áreas naturais vêm sofrendo uma redução considerável de sua cobertura vegetal devido a exploração intensiva, causando uma redução das florestas naturais e, conseqüentemente, formando vários fragmentos de vegetação (THIAGO; MAGALHÃES; SANTOS, 2020).

Em virtude disso, torna-se urgente a conservação dos recursos naturais, no qual diversos estudos voltados para a conservação de espécies vegetais vêm sendo desenvolvidos, a fim de preservar a diversidade existente e desenvolver o manejo sustentável (FREITAS *et al.*, 2013).

Atualmente, com o auxílio de marcadores moleculares é possível obter dados relacionados a estrutura genética de populações de espécies vegetais, podendo auxiliar no monitoramento de ações como: planos de manejo, restaurações de áreas degradadas, corredores ecológicos, fluxo gênico e tamanho mínimo de reservas ambientais (KAGEYAMA *et al.*, 2003).

Os marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) vêm sendo muito utilizados em estudos de diversidade genética de populações, apresentando características favoráveis para o seu uso (RAMALHO *et al.*, 2016). Dentre essas características, a alta reprodutividade em espécies vegetais no geral, o que torna esse marcador não específico para uma única espécie. Ademais, apresenta uma técnica laboratorial de baixo custo e não necessita do conhecimento prévio da sequência de DNA (BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011).

Os marcadores ISSR possuem caráter dominante, o que pode ser considerado um ponto negativo, por não diferenciar o tipo de genótipo, apesar disso, esse

marcador é muito utilizado em programas de melhoramento genético e em estudos de diversidade genética (LORENZONI *et al.*, 2014).

Neste contexto, o uso de marcadores moleculares dominantes como o ISSR torna-se uma ferramenta de extrema importância para os estudos de diversidade genética de espécies vegetais, principalmente para espécies onde estudos ainda são escassos na literatura, como é o caso da *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlmann.

A *Paratecoma peroba* é uma espécie da família Bignoniaceae nativa da Mata Atlântica, sendo endêmica do Brasil, distribuindo-se pelos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (FLORA DO BRASIL, 2020). Durante décadas sua madeira foi considerada de importância econômica, tornando-se muito comercializada em construções de móveis de luxo, acabamento de casas e construções comerciais (LINS; NASCIMENTO, 2010).

Com a fragmentação de seu bioma, somado a intensa exploração de sua madeira, a espécie atualmente se encontra em perigo (EN), conforme o Livro Vermelho da Flora do Brasil (MARTINELLI; MORAES, 2013) e criticamente em perigo (CR) pela lista de espécies ameaçadas de extinção no Espírito Santo (SIMONELLI; FRAGA, 2007). Dessa forma, torna-se urgente investimentos em estudos a fim de verificar a existência de subpopulações de *P. peroba*, considerando a viabilidade populacional e sua proteção ambiental (SIMONELLI; FRAGA, 2007).

Para o estado do Espírito Santo, a inexistência de estudos envolvendo *P. peroba* é preocupante, tendo em vista que o estado é um dos poucos que ainda se tem o registro da espécie. Neste sentido, informações sobre a diversidade e estrutura genética populacional são importantes em programas de conservação genética.

À vista disso, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a diversidade genética e analisar a estrutura genética em populações da espécie *P. peroba* ocorrentes em regiões de remanescentes de Floresta Atlântica na região sul do estado do Espírito Santo. Espera-se que as populações estudadas possam ser utilizadas como fonte de sementes para a produção de mudas com alta variabilidade genética.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia, distribuição geográfica e características morfológicas da espécie *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlman.

Paratecoma peroba (Record) Kuhlman. foi descoberta e descrita por Samuel James Record em 1924, nomeada primeiramente como *Tecoma peroba* Record. (IPNI, 2020). Porém, em 1931 foi atribuída a um novo gênero, nomeado cientificamente como *Paratecoma*, pelo cientista Kuhlmann, sendo atribuída o nome *Paratecoma diandra* Kuhlman. (IPNI, 2020). O nome científico aceito e correto é *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlman. (FLORA DO BRASIL, 2020).

Paratecoma peroba pertence à família Bignoniaceae que em território brasileiro possui por volta de 417 espécies, sendo a região sudeste o lugar com maior parte dos indivíduos, apresentando 224 espécies (FLORA DO BRASIL, 2020).

Dentro do contexto de espécies arbóreas de Bignoniaceae e pertencentes a tribo Bignonieae, *P. peroba* é uma espécie considerada monotípica, ou seja, é a única espécie presente dentro do gênero *Paratecoma* (LINS; NASCIMENTO, 2010). Esse gênero atualmente pertence ao clado “Tabebuia alliance” (OLMSTEAD *et al.*, 2009).

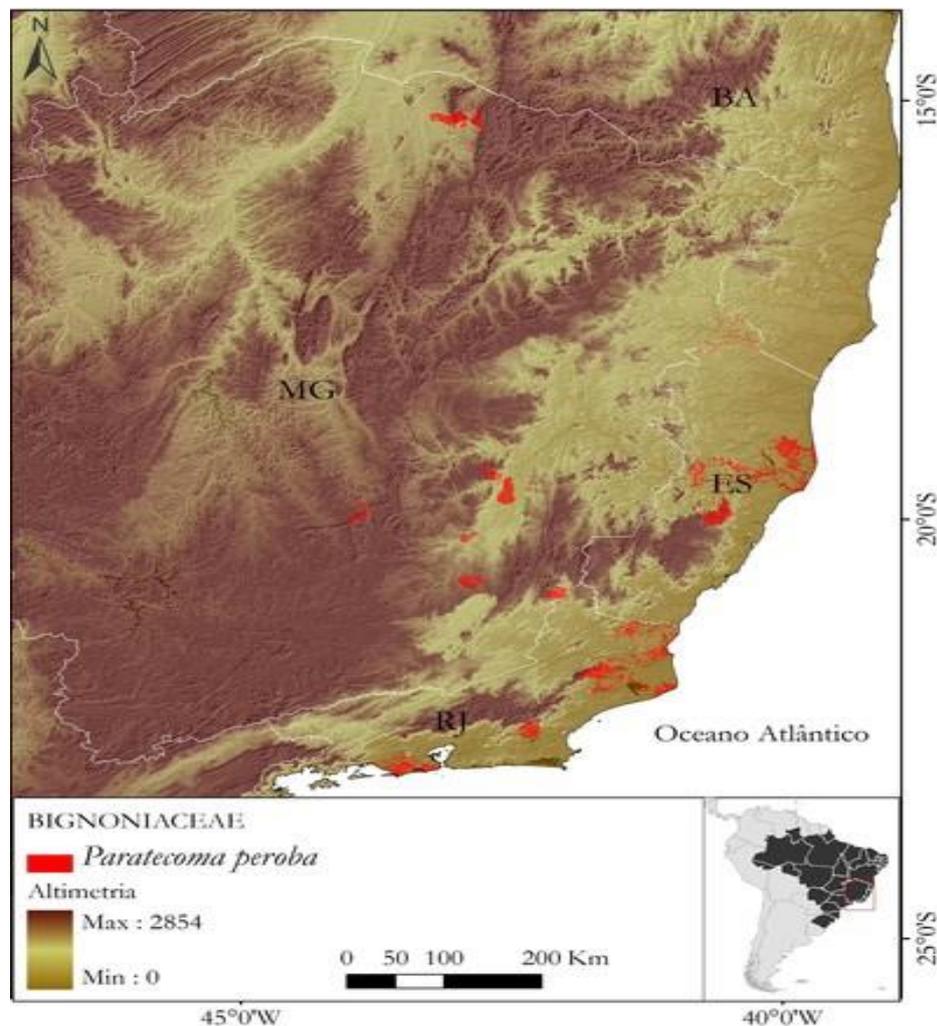
É conhecida em vários estados brasileiros como ipê peroba, peroba amarela, peroba manchada, peroba do campo, peroba branca, peroba tigrinha, peroba tremida, peroba verdadeira, peroba resaca, peroba da Bahia, ipê, perobinha e ipê rajado (GERRY, 1954; FLORA DO BRASIL, 2020).

Sendo uma espécie endêmica do Brasil e nativa da Mata Atlântica, possui ocorrência nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo (Figura 1) (FLORA DO BRASIL, 2020). Contudo, no estado do Rio de Janeiro atualmente é considerada uma espécie praticamente extinta (GENTRY, 1992). Com distribuição descontínua, pode se apresentar em grandes agrupamentos em determinadas áreas ou ausente em outras (LORENZI, 2002).

Pode ocorrer tanto em Florestas Estacionais Semidecíduais (ARCHANJO *et al.*, 2012; ABREU *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016), quanto em Florestas úmidas de terras baixas (SILVA; NASCIMENTO, 2001; ENGEL; MARTINS, 2005), sendo classificada

como secundária tardia (VILLELA *et al.*, 2006; ABREU *et al.*, 2014). Além disso, pode ser registrada no interior da floresta primária densa, como também pode tolerar as formações abertas secundárias (LORENZI, 2002).

Figura 1. Distribuição geográfica de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. no Brasil



Fonte: CNCFlora (2012).

A respeito das características morfológicas, é uma espécie que pode atingir dimensões próximas de 40m de altura e 80 cm de diâmetro à altura do peito (DAP) ao atingir a idade adulta. Possui um tronco simétrico com fendas longitudinais e manchas claras, tronco longo e livre de galhos com uma coloração pardo acinzentado. Sua copa possui muitos galhos, sendo muito densa, permitindo pouca passagem de luz nos substratos inferiores da floresta (Figura 2) (GENTRY, 1992; COSTA; SOUZA; SOUZA, 2011).

Figura 2. Hábito (A) e características do caule (B) de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlmann.



Fonte: Acervo pessoal de Leticia Rigo Tavares

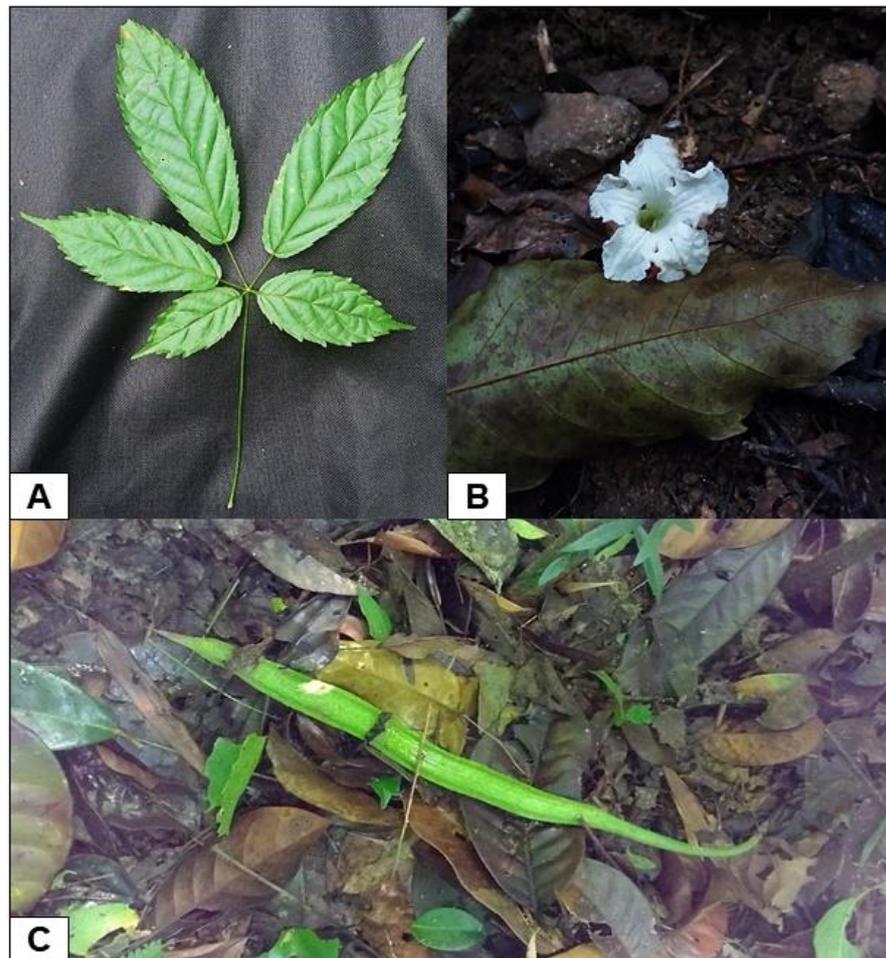
As folhas são digitadas, com 5 folíolos oblongo-caudados (ápice com 2-4 cm de comprimento), obtusos na base, fundamente serrados, membranáceos, glabros, com as nervuras delicadamente impressas, 7-20 x 2,5-7 cm; pecíolo comum até 10 cm; peciólulos 1-4 cm (Figura 3 - A) (COIMBRA-FILHO, 1951).

As flores são formadas por inflorescência cimeiras bi-trifloras, 8-15 cm de comprimento, apenas pubérula; pedicelos bibracteolados, 6-7 mm. Flores alvacentas e pequenas; cálice campanulado, com 5 lobos denticulados; corola 3-3,5 cm, longamente tubulosa, com limbo curto, finamente velutina; estames 2 exsertos, cujas anteras são curvas e com lóculos divergentes na maturidade; estaminódios (curtos filetes sem anteras) 3, ocultos no tubo corolino; disco conspícuo; ovário e estilete; estigma foliáceo, bilobado (Figura 3 – B) (COIMBRA-FILHO, 1951).

O fruto possui o formato ensiforme, com uma casca muito dura, possui fendas laterais que abrem em duas partes (Figura 3 – C), e suas sementes possuem uma

asa foliácea e translúcida (COSTA; SOUZA; SOUZA, 2011). As dimensões do fruto podem variar no Espírito Santo com frutos 2-2,5 vezes mais compridos (COIMBRA-FILHO, 1951).

Figura 3. Folha (A), flor (B) e fruto (C) de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlmann.



Fonte: Acervo pessoal de Leticia Rigo Tavares

Segundo Lins e Nascimento (2010) a floração da peroba do campo ocorre entre o período seco e o chuvoso. A peroba apresenta uma estratégia de floração denominada “Big Bang”, esse padrão de floração é comum em plantas tropicais, onde o objetivo é atrair polinizadores oportunistas com uma explosão de flores em uma determinada época do ano e em curto período de tempo (BARBOSA, 2014).

A reprodução de *P. peroba* possui um padrão de reprodução denominado supra anual, com transição do período seco para o chuvoso, entre setembro e novembro (NEWSTROM *et al.*, 1994; LINS; NASCIMENTO, 2010).

Os frutos imaturos correspondem ao período quente e úmido, enquanto os maduros estão relacionados a transição do período seco para o chuvoso, comportamento que pode ser associado a dispersão de sementes pelo vento. Os frutos surgem no topo da copa, quando maduros liberam sementes que são dispersas pelo vento (anemocoria) (COSTA; SOUZA; SOUZA, 2011).

A peroba do campo é uma árvore elegante, com madeira de boa qualidade, sendo apropriada para móveis de luxos e acabamentos de casas (LORENZI, 2002), dessa forma, sua madeira já foi muito explorada, o que levou essa espécie estar atualmente classificada como em risco de extinção (MARTINELLI; MORAES, 2013).

Apresenta características importantes sob os aspectos ecológicos, como em estudos de recomposição florestal e recuperação de áreas degradadas, além de econômicos, como uso de sua madeira, produção de mudas e paisagismo. Em estudos envolvendo compostos químicos encontrados nas árvores de *P. peroba*, foi constatado a presença de compostos que impediam o crescimento de bactérias, indicando um grande potencial para o desenvolvimento de novos bactericidas (PINHEIRO, 2014).

2.2. Marcadores moleculares

Marcadores moleculares podem ser definidos como sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) específicas encontradas no genoma e são empregados na diferenciação genética de dois ou mais indivíduos, podendo ser classificados em dois tipos: bioquímicos e genéticos (BERED; BARBOSA NETO; CARVALHO, 1997).

A detecção do polimorfismo genético a nível de DNA foi uma das conquistas da Biologia Molecular, pois pode ser incluído todas as espécies vegetais em diversos tipos de estudos envolvendo marcadores (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Com o progresso das tecnologias moleculares, foi possível manipular e analisar o DNA, ademais, esse avanço foi acompanhado com o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática e de estatísticas (REGITANO, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2009). Isso permitiu o desenvolvimento de diferentes tipos de marcadores moleculares e sua aplicação em diferentes áreas de estudo (NADEEM *et al.*, 2018).

Há uma variedade de marcadores moleculares existentes, para diferentes finalidades, onde cada um pode apresentar vantagens e desvantagens. Sua aplicação pode ser feita em inúmeras áreas de estudo e cada vez mais vêm sendo utilizados no melhoramento genético de plantas (AGUIAR, 2012).

Nesse sentido, a partir de novas técnicas desenvolvidas na Biologia Molecular, o progresso de pesquisas na área de melhoramento genético de plantas pode ser realizado com uma maior rapidez e segurança (BERED; BARBOSA NETO; CARVALHO, 1997).

Os marcadores são utilizados nos programas de melhoramento como uma ferramenta para auxiliar diferentes finalidades, tais como: obtenção de genótipos superiores, mapeamento genético, análise de diversidade genética, identificação de genes, isolamento e melhoramento assistido (AMABILE; VILELA; PEIXOTO, 2018).

Os marcadores moleculares baseados no DNA possuem técnicas mais simples e mais rápidas quando comparado aos marcadores morfológicos (BERED; BARBOSA NETO; CARVALHO, 1997).

Os marcadores podem ser divididos em três classes: hibridização, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento. Também podem ser classificados de acordo com a sua herança alélica, como dominantes e codominantes, sendo essa característica de extrema importância para o objetivo do estudo (ZOLET *et al.*, 2017).

Marcadores dominantes não conseguem diferenciar dois alelos presentes no mesmo organismo, ou seja, não discriminam os heterozigotos dos homozigotos (HOFFMANN; BARROSO, 2006). Já os marcadores codominantes possuem a capacidade de distinguir os genótipos dos indivíduos, porém quando comparado com marcadores multilocus, ou seja, de múltiplas regiões gênicas, a quantidade de informação obtida em cada ensaio é bem menor, por serem marcadores de locus únicos (FALEIRO; ANDRADE, 2011).

2.3. Marcador Molecular *Inter Simple Sequence Repeat* – ISSR

O marcador *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) é uma técnica baseada em PCR e utiliza apenas um *primer* com 16 - 25 bases, onde essas sequências se anelam

e amplificam regiões entre os SSR (GODWIN *et al.*, 1997). É considerada uma técnica de baixo custo, simples e rápida, na qual a visualização das ampliações pode ser através do gel de agarose com detecção por brometo de etídeo ou de poliacrilamida com detecção por nitrato de prata (ZOLET *et al.*, 2017). O polimorfismo pode ser calculado através da presença ou ausência de bandas nos géis (CULLEY; WOLFE, 2001).

Possui vantagens quando comparado com outros marcadores baseados em PCR, superando problemas de baixa reprodutibilidade e baixa temperatura de anelamento do RAPD (BINNECK; NEDEL; DELLAGOSTIN, 2002; TIKUNOV *et al.*, 2003; GUIMARÃES, *et al.*, 2009). Em marcadores SSR (*Simple Sequence Repeated*), por exemplo, há a limitação de ser específico para uma única espécie, não podendo haver a transferibilidade de primers. Já em ISSR, não é necessário um conhecimento prévio das sequências, tornando a técnica mais simples e menos custosa (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). Em alguns estudos foi possível realizar a transferibilidade de primers de microssatélites, porém apenas para espécies que são filogeneticamente próximas (BOMBONATO, *et al.*, 2019).

A característica de ser um marcador com padrão dominante pode apresentar uma desvantagem quando comparado com um marcador com padrão codominante, pois não apresentam a capacidade de distinguir homozigotos dominantes de heterozigotos, apenas detectam a presença ou ausência de um alelo (ZOLET *et al.*, 2017).

Os marcadores ISSR possuem transferibilidade e reprodutibilidade altas dos resultados em diferentes laboratórios, gerando alto número de fragmentos polimórficos. Quando comparado com os marcadores RAPD e RFLP, são mais informativos, sendo muito utilizados em estudos de diversidade genética (AMMIRAJU, *et al.*, 2001; VIANNA, *et al.*, 2019).

A utilização de marcadores ISSR vem crescendo em áreas como o relacionamento filogenético de espécies (HOCAOGLU-OZYIGIT *et al.*, 2020), diversidade genética (FELIX *et al.*, 2020), construção de mapas de genéticos (AMORIM, 2009) e melhoramento genético de plantas e seleção assistida (GODWIN *et al.*, 1997; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

2.4. Diversidade e Estrutura Genética de Populações

O estudo da diversidade genética compreende o entendimento da variação genética de alelos das espécies, intrapopulacional e interpopulacional. Dessa forma, informações sobre a ecologia e a genética de populações naturais são importantes para o desenvolvimento de práticas conservacionistas e melhoramento genético (KAGEYAMA *et al.*, 2003; FAJARDO; VIEIRA; MOLINA, 2016). Quanto maior for a variabilidade genética existente dentro de uma população, maiores serão as chances de perpetuação e adaptação as mudanças ambientais.

A perda da variabilidade genética pode ocorrer devido a dois fatores: a redução populacional, que irá a criar um gargalo genético e a perda de alelos pela deriva genética. A fragmentação pode acarretar a redução populacional devido a amostra pequena do conjunto genético dos indivíduos em remanescentes, sendo possível que ocorram gargalos genéticos. Se a população permanecer isolada durante anos, é provável que ocorra a perda de alelos pela deriva genética (SÁNCHEZ, 2008).

A estrutura de uma população é o conjunto de estudos sobre a ecologia de populações e a genética populacional, que juntas complementam teorias importantes para o entendimento das frequências alélicas e genotípicas de uma ou mais populações. A estruturação genética ocorre pelos padrões de reprodução e de distribuição espacial e geográfica, bem como dispersão de pólen e sementes. O manejo de florestas necessita do entendimento dos fatores que podem afetar o fluxo gênico de uma população, para garantir que o processo de conservação seja eficiente (MARTINS, 1987).

Nos organismos vegetais, o fluxo gênico pode ser regulado durante a dispersão de sementes e pólen, assim como por fatores bióticos e abióticos (MARTINS, 1987). A polinização pelo vento promove a diferenciação em áreas distantes, dentro e entre as populações. Já os polinizadores, como abelhas e aves, podem aumentar a variabilidade dentro da população e diminuir a divergência entre as populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Plantas que possuem o sistema sexuado podem apresentar uma variabilidade genética maior do que plantas que apresentam reprodução sexuada e assexuada, ou seja, de forma clonal, dessa forma, o fluxo

gênico irá depender do tipo de reprodução que a espécie apresenta (FISCHER *et al.*, 2000).

Plantas alógamas apresentam variabilidade genética e heterozigosidade altas, porém possuem baixa diferenciação entre as populações. Já plantas autógamas, possuem variabilidade genética e heterozigosidade reduzidas, com grande divergência entre os indivíduos dentro da população. Outros fatores também podem afetar a estrutura genética, relacionados a atributos da própria espécie, tais como: dispersão de sementes, síndrome de polinização morfologia da flor, dormência, ciclo de vida, estágio de produção, tipo de sistema sexual e reprodutivo (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Além dos fatores relacionados a reprodução, existem outros que podem ser citados, relacionados a população e a passagem. A densidade e a distribuição dos indivíduos são importantes para a compreensão de como está estruturada uma população, uma vez que nenhuma estrutura se mantém fixa durante anos, podendo mudar durante o tempo e o espaço (SILVA; MARTINI; ARAUJO, 2009).

A avaliação da estrutura de uma população contribui para o conhecimento do fluxo alélico que está ocorrendo entre e dentro da população (FAJARDO; VIEIRA; MOLINA, 2016). Ademais, compreender o resultado das modificações antrópicas e da heterogeneidade ambiental, permite o desenvolvimento de um manejo sustentável e efetivo das populações (NEVES; WADT; GUEDES, 2016).

2.5. A importância da manutenção da variabilidade e diversidade genética vegetal

Cerca de 25% das 250.000 espécies vegetais estimadas de plantas vasculares no mundo podem ser extintas em até 50 anos, culminando com perdas irreversíveis. Devido a essa problemática, a preocupação com a conservação da diversidade genética em áreas naturais vem crescendo em diferentes países (SILVA; MARTINI; ARAUJO, 2009). Cada vez mais, áreas naturais vêm sendo destruídas e fragmentadas pelas ações antrópicas, diminuindo drasticamente a variabilidade genética em populações selvagens (MATOCQ; VILLABLANCA, 2001).

Existem diversas causas que podem estar relacionadas com a extinção de uma espécie e, entre essas causas, pode-se citar a fragmentação de áreas naturais, a perda de habitats, a instabilidade demográfica e o endocruzamento. Estudos sobre a estrutura de populações se tornam uma ferramenta de extrema importância para a conservação de espécies ameaçadas, pois auxiliam no entendimento da dinâmica de populações naturais, mostrando as consequências da redução da variabilidade genética e diminuição do fitness (MATOCQ; VILLABLANCA, 2001).

Áreas naturais vêm sofrendo cada vez mais destruição e fragmentação devido as ações antrópicas, transformando diretamente os ecossistemas, causando impactos nos ciclos biogeoquímicos, no clima global e nas populações selvagens (LANDE, 1988). A fragmentação de habitats naturais pode causar a redução de populações, resultando em pequenas porções, diminuindo o número de indivíduos, e isso pode estar diretamente relacionado ao efeito fundador, uma vez que a redução da diversidade genética diminui o potencial adaptativo e evolutivo das espécies (BOUZAT, 2001; MAUÉS; OLIVEIRA, 2010).

Nesse sentido, níveis baixos de diversidade genética podem levar a população ao caminho da extinção e com a fragmentação, as populações podem se tornar isoladas, modificando sua reprodução. A polinização é o primeiro estágio da reprodução nas angiospermas, e com a ameaça da fragmentação florestal sobre este processo, pode acarretar em diversas modificações, como alterações dos tipos de polinizadores, bem como mudança no comportamento dos polinizadores (HARRIS; JOHNSON, 2004; MAUÉS; OLIVEIRA, 2010).

Populações pequenas tendem a possuir baixa diversidade, podendo resultar em uma redução do potencial evolutivo das espécies (BOUZAT, 2001). Em um efeito a curto prazo, as frequências alélicas podem ser afetadas devido a diminuição do número de indivíduos dentro de uma população, aumentando a probabilidade da ocorrência da deriva genética, e em um efeito a longo prazo, a população pode estar mais sujeita ao aumento da endogamia e da deriva genética (KAGEYAMA; GANDARA 1998).

O endocruzamento em pequenas populações pode desencadear o aumento de alelos homozigotos (deletérios recessivos) que antes estavam mascarados em heterozigose, aumentando a homozigose dentro da população, causando a perda de

diversidade genética. A deriva genética em populações pequenas tende a reduzir a variabilidade genética, devido ao aumento da homozigose, ocorrendo a diminuição do fitness, na qual a população pode se tornar menos resiliente a mudanças ambientais (LANDE, 1988).

É válido ressaltar que nem sempre o tamanho da população influencia a variabilidade genética, sendo possível encontrar populações pequenas com uma grande diversidade e apresentando uma estabilidade em relação aos efeitos da deriva genética (GODT; HAMRICK; BRATTON, 1995). Contudo, a variabilidade genética encontrada em populações menores tende a ser baixa (BOTREL *et al.*, 2006).

Pode se dizer que a diversidade genética encontrada nas populações não está totalmente relacionada ao tamanho da reserva, e que nem sempre uma reserva grande indica a melhor estratégia para a conservação das espécies em risco de extinção (BROWN, 1999). Sendo assim, para obter o sucesso de uma reserva, independentemente do tamanho, é necessário ter um manejo adequado (TANSLEY; BROWN, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar a diversidade e analisar a estrutura genética em populações da espécie *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl, ocorrente em remanescentes de Floresta Atlântica na região sul do Espírito Santo.

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar e demarcar utilizando (Sistema de Posicionamento Global – GPS) indivíduos adultos e regenerantes da espécie selecionada presentes em remanescentes de Floresta Atlântica do Espírito Santo;

- Estimar e comparar a magnitude e a distribuição da variabilidade genética entre os indivíduos demarcados utilizando marcadores Inter Simple Sequence Repeat- ISSR;
- Obter informações que contribuam de maneira efetiva para a identificação de populações base para estudos de pré-melhoramento e a conservação *in situ* e *ex situ* da espécie de estudo, presente em remanescentes de Floresta Atlântica no Estado do Espírito Santo;
- Avaliar o potencial das populações estudadas para serem utilizadas como fonte de sementes para a produção de mudas com alta variabilidade genética.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de Estudo

As coletas foram autorizadas pela licença Instituto Chico Mendes (ICMBIO). Foram coletadas folhas saudáveis da espécie *Paratecoma peroba* no período de agosto de 2020 a janeiro de 2021.

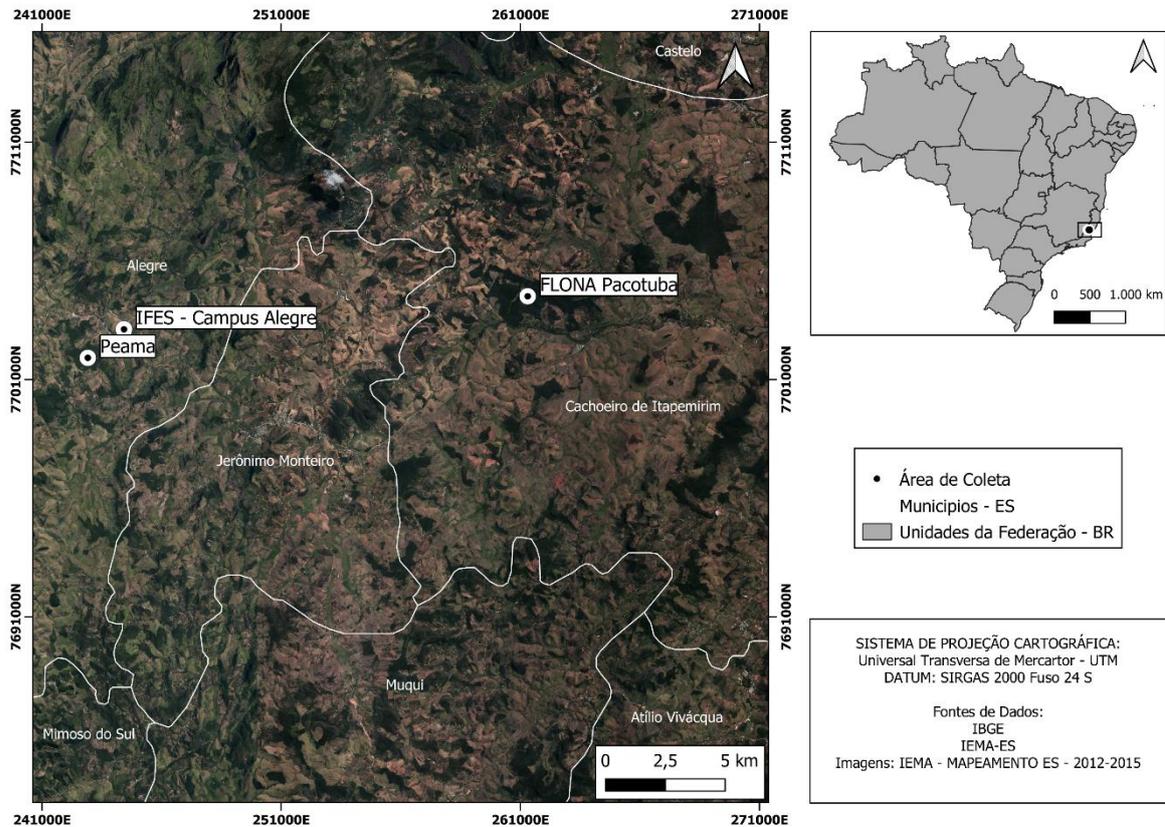
Foi feito um estudo prévio para a escolha das áreas, onde o critério para a seleção era a ocorrência da espécie em estudo. Dessa forma, foram utilizados estudos já realizados nas áreas, bem como planilhas de coordenadas de árvores já marcadas disponibilizadas por servidores das áreas selecionadas.

Todas as populações estudadas estão presentes no sul do estado do Espírito Santo (Figura 4). As populações selecionadas totalizaram três (Tabela 1).

Tabela 1. Populações de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlm. selecionadas no sul do estado do Espírito Santo

População	Localização	Indivíduos
1	Polo de Educacional Ambiental (PEAMA), Rive, Alegre, ES	1 - 64
2	Floresta Nacional de Pacotuba (FLONA), Pacotuba, Cachoeiro de Itapemirim, ES	65 - 96
3	Instituto Federal do Espírito Santo, Rive, Alegre, ES	97 - 116

Figura 4. Mapa de localização dos pontos de coletas, indicando as três populações de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlm. no sul do estado do Espírito Santo



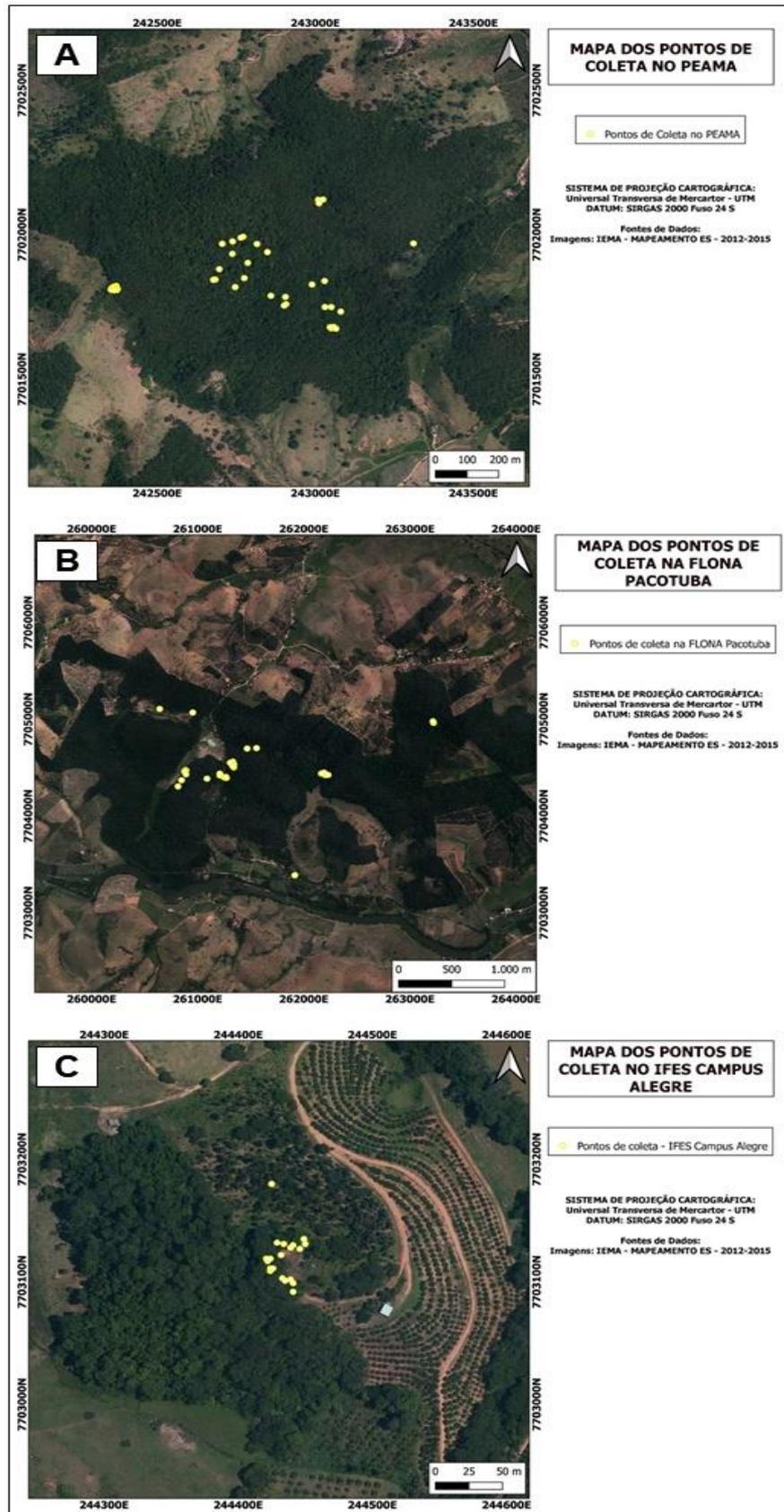
Fonte: Autor (2021)

4.2. Amostragem e Coleta do Material Vegetal

Os indivíduos de *P. peroba* foram coletados nas três áreas indicadas na Figura 5. Antes da coleta do material vegetal, os seguintes dados dendométricos foram analisados: DAP (diâmetro na altura do peito), análise da posição do fuste, vigor, tipo de paisagem, presença/ausência de frutos e de flores. Todas essas informações foram registradas em campo e posteriormente organizadas em planilha do Excel.

O método utilizado para encontrar os indivíduos baseou-se em busca ativa e procura visual, com o auxílio de um GPS Garmin GPSMAP 62sc portátil. Os indivíduos foram georreferenciados, e marcados com fita zebra, sem prejudicar o tronco.

Figura 5. Indivíduos de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. marcados nas três populações. A: PEAMA. B: FLONA de Pacotuba. C: IFES



Fonte: Autor (2021).

Para coleta do material vegetal, foi utilizado um estilingue, retirando-se no máximo cinco folíolos, de preferência sem danos (mecânicos), e sinais de doenças, como fungos, por exemplo. As folhas coletadas foram armazenadas em sacos de papel contendo sílica gel, para que o processo de oxidação fosse retardado.

O material coletado foi transportado para o laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFES campus de Alegre, com posterior armazenamento em um freezer -30°C em sacos de alumínio, para que fosse realizado em seguida o processo de extração de DNA.

4.3. Extração e Quantificação de DNA

O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo Doyle e Doyle (1990), com modificações propostas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Foi adicionado aproximadamente 300 mg de tecido foliar, com auxílio de um gral e pistilo de porcelana. O tecido foliar foi macerado na presença de nitrogênio líquido, onde o conteúdo foi transferido para um eppendorf de 2ml, no qual foi adicionado 700µl de tampão de extração (1,4 mM NaCl, 100 mM Tris-HCL, Ph 8; 20 mM EDTA; 1% polivinilpirrolidona (PVP), 2% CTAB. Durante 30 minutos os tubos permaneceram em banho maria e a cada 10 minutos eram agitados com intuito de homogeneizar a solução.

Após o resfriamento dos eppendorfs, foi adicionado 650 µl de clorofórmio e álcool isoamílico 24:1 (v:v) e centrifugados por 1200 rpm durante 10 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi transferida a novos tubos de 2 ml, onde foi adicionado 650 µl de clorofórmio e álcool isoamílico 24:1 (v:v) e 200 µl de solução tampão e centrifugados novamente por 1200 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em um novo eppendorf de 1,5 ml, em seguida foi adicionado clorofórmio e álcool isoamílico 24:1 (v:v) e centrifugados por 1200 rpm durante 10 minutos.

O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol gelado e 230 µl de acetato de amônio. O precipitado foi lavado 3x com etanol 70%, em seguida, após a retirada do etanol, o pellet foi seco na temperatura ambiente. Após esta etapa, o pellet foi

suspendido com 40 µl de TE com RNase (40 µg/ml) em banho maria por 30 minutos a 60°C.

Para avaliar a concentração e a pureza do DNA extraído, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria no NanoDrop 2000 *ThermoScientific*. O parâmetro utilizado, foi a relação 260/280, que é considerada ideal quando está dentro do intervalo de 1,8 a 2,0, indicando que não há contaminações (BARBOSA, 1998).

4.4. Seleção e amplificação dos primers de ISSR

Inicialmente, foi feito um teste com os 43 primers da *University of British Columbia* (Tabela 1), onde de todos os iniciadores testados, 10 primers foram selecionados. O critério de escolha, foi a presença de grande quantidade de fragmentos polimórficos e qualidade da amplificação.

O termociclador utilizado foi o *Applied Biosystems* com 96 poços. As reações de amplificação via polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas com a temperatura inicial de 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos, de 45 s a 94°C, em seguida 45 s a 52°C, 1m30s a 72°C, por fim sendo a última etapa 7m a 72°C. O volume final das reações dentro das placas eram 20µl contendo o mix de PCR: Tampão (1x), 0,25 Mm de cada Dntp, 0,2 de primer e 1 unidade de Taq DNA polimerase.

Antes de realizar as amplificações o DNA, foi padronizado para que todas as amostras estivessem na mesma concentração. As amostras de DNA foram diluídas a 10 ng. As amplificações foram observadas em géis de agarose 2% com TBE 1x (10,8 g/L Tris-base; 5,5 g/L Ácido Bórico; 0,83 g/L EDTA e água destilada). Os géis foram expostos a uma voltagem de 100v durante 4 horas e, posteriormente os géis foram corados com brometo de etídio durante 20 minutos. Após esse processo para visualizar as bandas, foi necessário utilizar um fotodocumentador sob luz UV (*ChemiDoc MP Imaging System* – Bio Rad), sendo assim foi possível visualizar a presença e ausência das bandas nos géis de agarose, o peso molecular utilizado para auxiliar nas visualizações dos tamanhos dos fragmentos formados foi *Ladder* 100pb.

Tabela 2. Primers ISSR produzidos pela *University of British Columbia* e suas respectivas sequências testados em amostras de DNA de quatro indivíduos da espécie *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. m.

Primers	Sequências (5'-3')
UBC 802	ATA TAT ATA TAT ATA TG
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC 813	CTC TCT CTC TCT CTC TT
UBC 814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
UBC 815	CTC TCT CTC TCT CTC TG
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG
UBC 822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
UBC 824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
UBC 829	TGT GTG TGT GTG TGT GC
UBC 833	ATA TAT ATA TAT ATA TYG
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
UBC 849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA TCC A
UBC 852	TCT CTC TCT CTC TCT CRA
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
UBC 861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
UBC 862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC 865	CCG CCG CCG CCG CCG CCG
UBC 866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
UBC 867	GGC GGC GGC GGC GGC GGC
UBC 868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
UBC 870	TGC TGC TGC TGC TGC TGC
UBC 874	CCC TCC CTC CCT CCC T
UBC 876	GAT AGA TAG ACA GAC A
UBC 877	TGC ATG CAT GCA TGC A
UBC 878	GGA TGG ATG GAT GGA T
UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA
UBC 884	HBH AGA GAG AGA GAG AG
UBC 886	VDV CTC TCT CTC TCT CT
UBC 887	DVD TCT CTC TCT CTC TC
UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG

* A = Adenina; T = Timina; C = Citosina; G = Guanina; H = (A, T ou C); R = (A ou G); V = (A, C ou G) e Y = (C ou T).

4.5. Análises Estatísticas

Foi feita a análise visual das bandas nos géis de agarose, na qual a leitura possibilitou a confecção de uma matriz binária, onde a presença da banda atribuía-se o valor 1 e a ausência o valor 0. As bandas que estavam presentes para os 116 indivíduos foram consideradas monomórficas, enquanto as bandas que ocupavam locais diferentes foram consideradas polimórficas. Com os dados obtidos pela matriz de codificação, foi possível realizar uma análise descritiva envolvendo o número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por primer e a faixa de variação de tamanho dos locos em pares de bases (TPB).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) será calculado para discriminar o poder do marcador em detectar polimorfismos entre os indivíduos, conforme proposto por Roldan-Ruiz *et al.* (2000), tendo como indicadores a ausência e a presença de bandas:

$$PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$$

Em que: PIC_i = O conteúdo de informação polimórfica do marcador i ;

f_i = A frequência dos fragmentos presentes na amostra;

$1 - f_i$ = A frequência dos fragmentos ausentes.

Com o auxílio do software POPGENE (YEH; BOYLE, 1999), foram calculados o Índice de Shannon (I), Índice de diversidade de Nei (H'), assim como os outros parâmetros de diversidade genética: número de alelos observados (N_a), número de alelos efetivos (N_e) e o fluxo gênico (N_m). A matriz de similaridade foi gerada de acordo com o coeficiente de Jaccard, a partir dela foi possível construir o dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) pelo software GENES.

A fim de verificar a qualidade do agrupamento, foi determinado o coeficiente de correlação cofenético (CCC), utilizando o software STRUTURE 2.3 (PRITCHARD *et al.*, 2000). A estrutura populacional foi avaliada por abordagem bayesiana a partir de simulações Monte Carlo via Cadeias de Markov e (MCMC). Com o programa GENES,

foi possível realizar a AMOVA para avaliar a distribuição da diversidade entre e dentro das populações, e o valor de Θ_{ST} das populações estudadas.

5. RESULTADOS

5.1. Seleção dos *Primers* ISSR

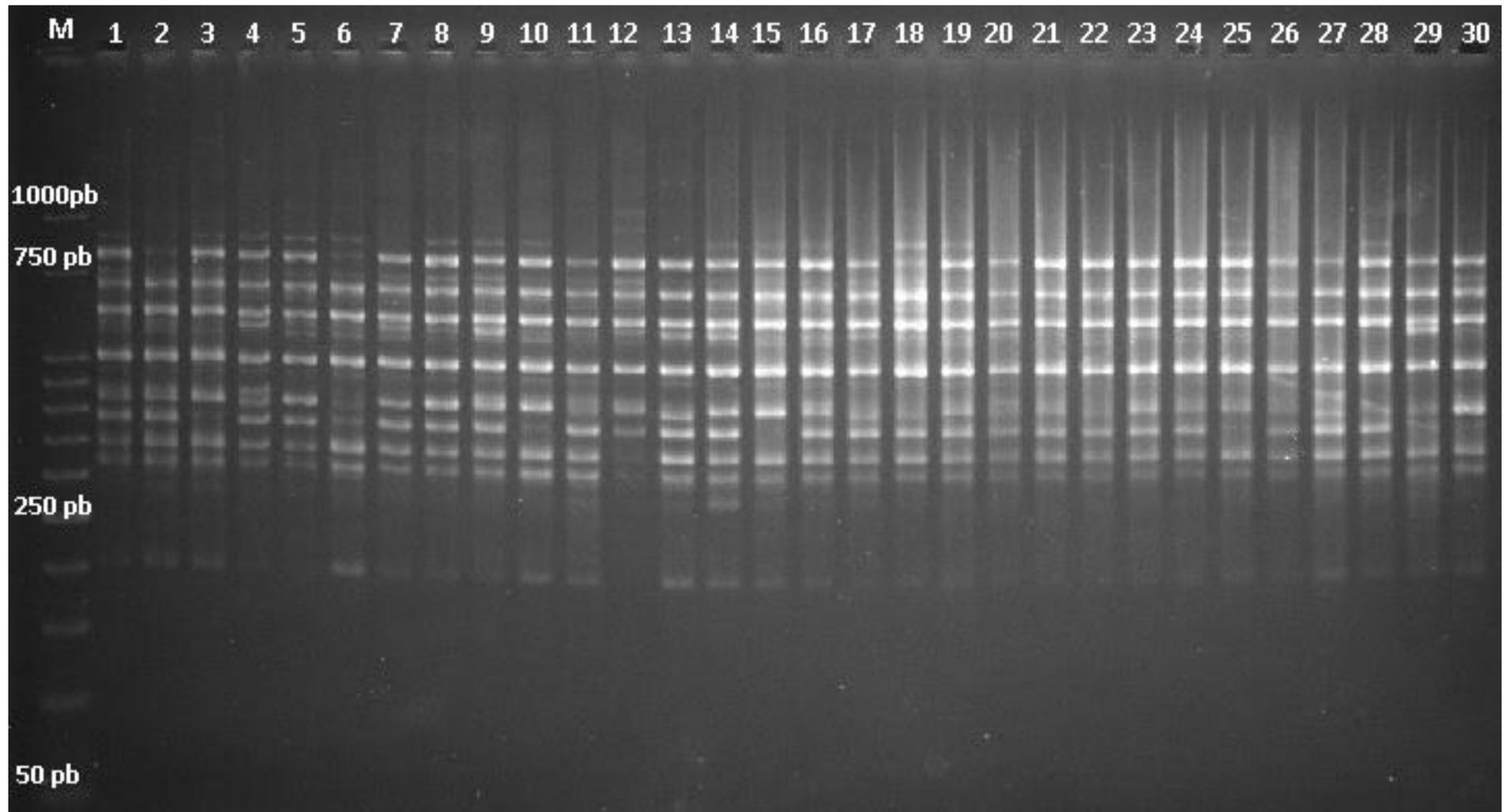
Dos 43 *primers* ISSR utilizados nos testes, apenas 10 foram selecionados por apresentarem fragmentos visíveis, com alta intensidade e nítidos para visualização, (Figura 6), gerando um total de 112 bandas, sendo 101 polimórficas, proporcionando 90,17% de polimorfismo. A quantidade de bandas por *primer* variou de 5 a 15 bandas com média de 11,4. Todos os *primers* apresentaram alto polimorfismo variando de 77,7% a 100%, indicando diversidade genética elevada nos indivíduos estudados nas populações.

O perfil de amplificação para o marcador UBC 807 com 30 amostras pode ser observado na Tabela 2. O valor do conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou entre 0,25 (UBC 812) e 0,36 (UBC 836 e UBC 868) com média total igual a 0,30. Alguns *primers* apresentaram os maiores valores de PIC (UBC 811, UBC 836 e UBC 868) e em outros menores valores foram encontrados (UBC 815 e UBC 812).

Tabela 3. Análise descritiva dos *primers* selecionados para *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por *primer*, faixa de variação de tamanho dos locos em pares de bases (TPB) e conteúdo da informação de polimorfismo (PIC)

<i>Primer</i>	NTB	NBP	PBP (%)	TPB (máx-min.)	PIC
UBC 807	14	13	92,8	980-200	0,314305
UBC 810	5	4	80	2080-400	0,337796
UBC 811	9	7	77,7	2080-400	0,362787
UBC 812	13	12	92,3	2080-310	0,266218
UBC 815	8	8	100	1600-550	0,251804
UBC 827	12	11	91,6	2080-480	0,315181
UBC 836	14	12	85,7	1200-320	0,360214
UBC 845	15	14	93,3	2080-320	0,297068
UBC 868	12	11	91,6	1080-480	0,363347
UBC 880	10	9	90	1700-300	0,283789
TOTAL	112	101	89,5	-	0,30925345

Figura 6. Fotografia de gel de agarose 2% mostrando o perfil de fragmentos formado pelo *primer* UBC 807 (1-30) para a espécie *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlm. (*Ladder* 100pb)



Fonte: Autor

5.2 Estrutura e Diversidade Genética das Populações

A matriz de dissimilaridade obtida para os 116 indivíduos por meio da complementaridade do coeficiente de Jaccard baseado nos marcadores ISSR, resultou em 13.456 índices de dissimilaridade, com média de 0,31 (Tabela 3). O coeficiente de Jaccard mede o grau de dissimilaridade entre dois conjuntos, e quando a análise é feita avaliando o grau de semelhança genética entre populações ou indivíduos, é possível encontrar dados importantes em relação a estrutura genética.

O par 4 x 66, indivíduos referentes a população 1 e 2, respectivamente, obteve a maior distância genética ($d= 0,8$), enquanto o par 73 x 74, indivíduos da população 2, obteve o menor valor ($d= 0,14035$). Os indivíduos que possuem menores distâncias pertencem ao mesmo agrupamento, enquanto o par de indivíduos que apresentam maior distância são de agrupamentos diferentes. Na Tabela 3 estão apresentados os 30 indivíduos que apresentaram maiores e menores distâncias.

As similaridades genéticas encontradas variaram de 0,34 a 0,24, sendo o menor valor encontrado para a população 3 e a população que apresentou menor divergência foi a população 2 (Tabela 3).

Tabela 4. Pares de genótipos que possuem valores extremos em maior e menor dissimilaridade (d) baseado na complementariedade do coeficiente de Jaccard, calculados a partir de 10 marcadores ISSR em 116 indivíduos de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. População 1= indivíduos de 1 a 64; População 2= indivíduos de 65 a 96; População 3= indivíduos de 97 a 116.

(Continua)

Ordem	Maior distância			Menor distância		
	Indivíduos	Populações	d	Indivíduos	Populações	d
1	4 x 66	1 x 2	0,80000	73 x 74	2 x 2	0,14035
2	69 x 110	2 x 3	0,79688	112 x 113	3 x 3	0,15152
3	69 x 107	2 x 3	0,78333	26 x 27	1 x 1	0,15789
4	4 x 65	1 x 2	0,77941	101 x 102	3 x 3	0,15789
5	4 x 72	1 x 2	0,76812	101 x 104	3 x 3	0,15789
6	4 x 67	1 x 2	0,76271	23 x 24	1 x 1	0,16364
7	4 x 86	1 x 2	0,76119	101 x 114	3 x 3	0,17241
8	6 x 69	1 x 2	0,75806	111 x 112	3 x 3	0,17391
9	69 x 108	2 x 3	0,75806	102 x 104	3 x 3	0,17460
10	15 x 69	1 x 2	0,75758	103 x 104	3 x 3	0,17460
11	4 x 68	1 x 2	0,75472	18 x 19	1 x 1	0,17808

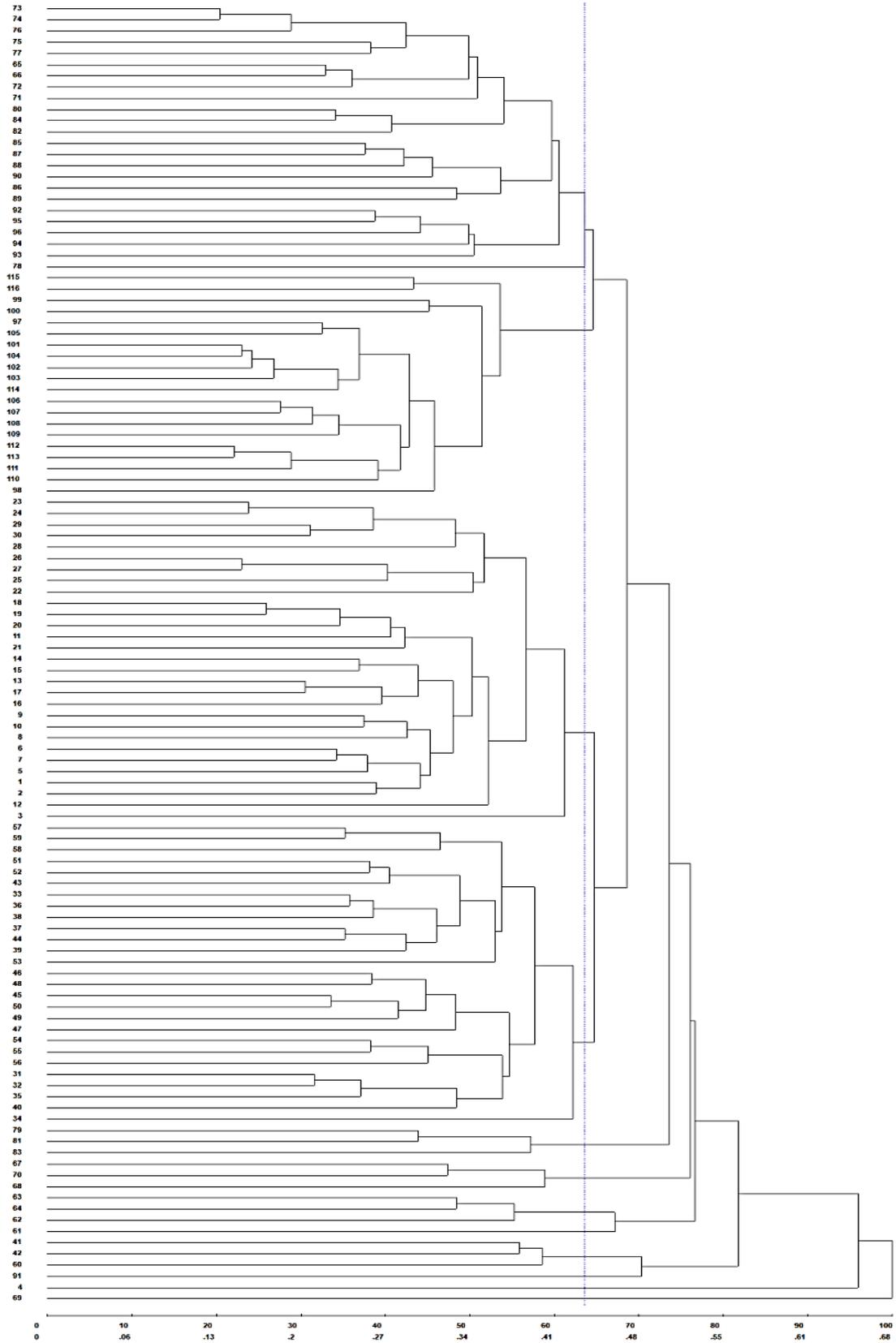
Tabela 4. Pares de genótipos que possuem valores extremos em maior e menor dissimilaridade (d) baseado na complementariedade do coeficiente de Jaccard, calculados a partir de 10 marcadores ISSR em 116 indivíduos de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. População 1= indivíduos de 1 a 64; População 2= indivíduos de 65 a 96; População 3= indivíduos de 97 a 116.

(Conclusão)

Ordem	Maior distância			Menor distância		
	Indivíduos	Populações	d	Indivíduos	Populações	d
12	14 x 69	1 x 2	0,75439	102 x 103	3 x 3	0,18750
13	69 x 93	2 x 3	0,75439	101 x 103	3 x 3	0,18966
14	4 x 110	1 x 3	0,75342	106 x 107	3 x 3	0,18966
15	69 x 98	2 x 3	0,75000	107 x 108	3 x 3	0,19048
16	4 x 69	1 x 2	0,75000	101 x 105	3 x 3	0,19298
17	4 x 90	1 x 3	0,74627	73 x 76	2 x 2	0,19643
18	11 x 69	1 x 2	0,74627	112 x 114	3 x 3	0,19697
19	69 x 111	2 x 3	0,74627	74 x 76	2 x 2	0,20000
20	2 x 69	1 x 2	0,74603	97 x 101	3 x 3	0,20000
21	7 x 69	1 x 2	0,74603	106 x 109	3 x 3	0,20690
22	4 x 107	1 x 3	0,74286	13 x 17	1 x 1	0,20968
23	18 x 69	1 x 2	0,74286	29 x 30	1 x 1	0,21429
24	58 x 69	1 x 2	0,74242	101 x 112	3 x 3	0,21667
25	69 x 106	2 x 3	0,74074	23 x 29	1 x 1	0,21739
26	4 x 34	1 x 1	0,73770	31 x 32	1 x 1	0,21739
27	69 x 109	2 x 3	0,73684	101 x 108	3 x 3	0,22034
28	69 x 87	2 x 2	0,73684	108 x 113	3 x 3	0,22059
29	4 x 70	1 x 2	0,73684	23 x 30	1 x 1	0,22222
30	4 x 87	1 x 2	0,73529	111 x 113	3 x 3	0,22222

As distâncias foram agrupadas pelo método UPGMA, plotando um dendograma (Figura 7). Através do método Mojema (K= 3), foi possível estimar o ponto de corte de 43,76, onde procedeu-se a divisão de 13 grupos. Por meio do coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi possível verificar a consistência dos agrupamentos, o valor obtido foi de 77% (CCC=0,77).

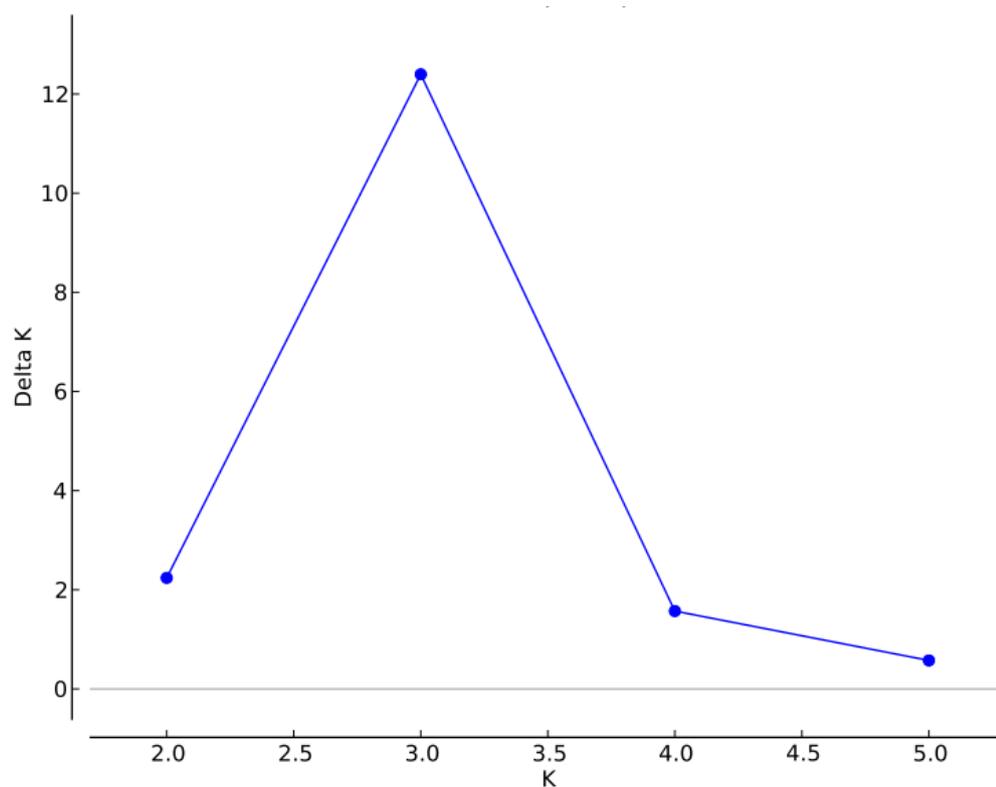
Figura 7. Dendrograma da dissimilaridade genética dos 116 indivíduos de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. utilizando o método UPGMA



No agrupamento formado com todas as populações, alguns indivíduos ficaram agrupados fora da sua população original. É possível observar na Figura 7 a formação de populações que compartilham informações genéticas, porém sem um agrupamento nítido. A população 2 apresentou um agrupamento mais nítido, com a maioria dos indivíduos agrupados juntos. Todas as populações apresentaram indivíduos dispersos em outras populações, diferentes das populações de origem. Pequenos grupos isolados foram formados com poucos indivíduos, sendo os indivíduos 4, 69 e 91 os mais divergentes, referentes as populações 1, 2 e 2, respectivamente.

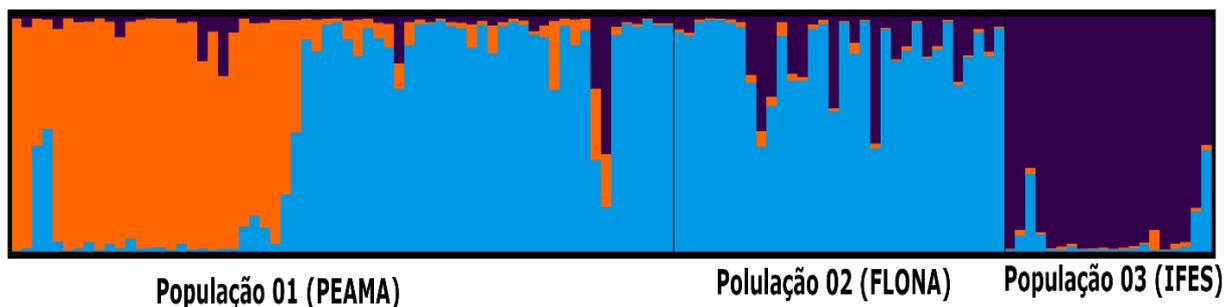
Para a análise da estrutura das populações, utilizou-se o software STRUCTURE 2.3.4, e em todas as amostras a abordagem bayesiana foi aplicada a fim de avaliar o número significativo de grupos genéticos prováveis. O número de K definido foi igual a 3 (K=3) (Figura 8).

Figura 8. Melhor valor de delta K obtido pelo software STRUCTURE



As populações 1 e 2 compartilham mais informações genéticas entre si. A população 3 apresentou pouca similaridade com outros grupos (Figura 9).

Figura 9. Representação gráfica obtida pela análise no software STRUCTURE, no qual cada grupo é representado por uma cor.



Os parâmetros de diversidade para a espécie *P. peroba* estão representados na Tabela 4. Os dados foram aferidos utilizando o software POPGENE 32. As análises foram feitas utilizando o total de indivíduos das populações e em individualidade para cada população amostrada.

Conforme os dados da Tabela 4, o número de alelos observados (N_a) variou entre 1,65 a 1,94. Para o número de alelos efetivos (N_e), o valor variou de 1,39 a 1,47. A partir de 101 locos, foi possível obter a diversidade genética das populações estudadas. Para o índice de Shannon (I), o menor valor encontrado ($I=0,33$) foi para a população 3 e o maior valor ($I= 0,43$) foi para a população 1. A diversidade genética de Nei (H') variou de 0,2272 a 0,2791, onde a população 3 apresentou o menor valor ($H'= 0,2272$), enquanto a população 1 apresentou o maior valor ($H'= 0,2791$).

O fluxo gênico estimado para o conjunto das populações estudadas foi alto ($N_m= 7,0114$).

De acordo com os resultados obtidos pela AMOVA, apresentados na Tabela 5, a maior parte da diversidade genética observada está dentro das populações (79,23%). O valor Φ_{ST} estimado foi de 0,20 indicando uma estrutura genética moderada entre as populações, estando próximo ao valor estimado por Nybom (2004), ($\Phi_{ST} = 0,35 \pm 0,25$).

Tabela 5. Estimativa da diversidade genética das populações estudadas de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlm.

POPULAÇÕES	N	Na	Ne	H'	I
01- PEAMA	64	1,9406	1,4494	0,2791	0,4329
02- FLONA	32	1,8416	1,4743	0,2749	0,4136
03- IFES	20	1,6535	1,3988	0,2272	0,3361
Todas as populações	116	1,9901	1,4933	0,3053	0,4716

N= Número de indivíduos; Na= Número de alelos observados; Ne= Número de alelos efetivos; H'= Diversidade genética de Nei; I: Índice de Shannon

Tabela 6. Análise da variância molecular (AMOVA) para as três populações de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlm.

FV	GL	QM	SQ	%
Entre	2	129,85	259,70	20,76
Dentro	113	13,02	1472,29	79,23
Total	115	15,06	1732,0	
ØST	0,20			

GL: Grau de liberdade; QM: Quadrado médio; SQ: Soma dos quadrados.

6. DISCUSSÃO

Segundo Wolfe (2005), o número de *primers* mais utilizado em estudos com o marcador ISSR é de 3-10, neste estudo foram selecionados 10 *primers*, por apresentarem alto polimorfismo e boa visualização. Em trabalhos com outras espécies, como *Moringa oleífera* Lam., *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori e *Asimina triloba* (L.) Dunal, foram utilizados 10 *primers* e ambos obtiveram resultados satisfatórios em relação as análises de diversidade genética das populações estudadas (POMPER *et al.* 2003; HASSANEIN; AL-SOGEER, 2018).

Diversos estudos de diversidade genética utilizando o marcador ISSR, obtiveram desempenho satisfatório, com quantidade de bandas polimórficas adequadas para as análises. No estudo de Silva *et al.* (2014), foram utilizados 12 *primers* no estudo da diversidade e estrutura genética de jenipapo (*Genipa americana* L.) onde 123 fragmentos polimórficos foram visualizados. Em Lorenzoni *et al.* (2014),

foram observadas 118 bandas polimórficas em 13 *primers* utilizados na avaliação da diversidade genética de 16 acessos de biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.] Baill).

Em ambos os estudos de Silva *et al.* (2014) e Lorenzoni *et al.* (2014), a quantidade de *primers* selecionados foram eficientes para aferir a diversidade e estrutura genética das espécies estudadas. No presente estudo, a quantidade de bandas polimórficas se mostrou suficientes para avaliar os critérios de diversidade e estrutura genética de *P. peroba*, sendo observados 101 locos para 10 *primers* utilizados, onde os valores para cada *primer* variaram de 77,7% a 92,8% com média de 89,5% de polimorfismo. O alto nível de polimorfismo encontrado indica que os *primers* foram satisfatórios para a estimar a relação genética entre os indivíduos das populações estudadas.

O alto polimorfismo também foi encontrado em outros estudos de diversidade genética em populações naturais de plantas onde o marcador molecular ISSR foi utilizado (WOLFE *et al.*, 1998; VIEIRA *et al.*, 2018).

Os valores de PIC representam a capacidade de um marcador detectar a variabilidade entre os indivíduos nas populações, valores maiores são mais adequados na detecção de variabilidade do que valores menores (PRECZENHAK, 2013, p. 21). Valores para o marcador ISSR que se aproximam de 0,25 a 0,50 são considerados mediamente informativos (DUARTE, 2015).

Neste estudo, os *primers* utilizados apresentaram performance mediana, variando de 0,26 a 0,36. Marcadores que apresentam o PIC elevado são eficientes para estudos de variabilidade genética, indicando a existência de uma variabilidade entre os indivíduos e contribuindo para a diferenciação dos genótipos (PRECZENHAK, 2013, p. 21). Alguns marcadores (UBC 811, UBC 836 e UBC 868) apresentaram os maiores valores de PIC, sendo recomendados para o uso de análise de diversidade genética para a espécie *P. peroba*.

O valor da estimativa do fluxo gênico (Nm) determina se a deriva genética entre os locais é suficiente para produzir variabilidade genética, se o valor for maior que 1,0 significa que o fluxo gênico entre as populações é forte o suficiente para evitar a diferenciação pela deriva genética (SLATKIN; BARTON, 1989). Um intenso fluxo gênico foi verificado entre as populações 1 e 2 ($Nm = 7.0114$). O fluxo gênico é um

importante evento onde o movimento dos genes entre as populações limita a divergência genética por homogeneizar os conjuntos gênicos, evitando a especiação e aumentando a variabilidade genética (RAPOSO, 2007).

O valor encontrado pode corresponder a um fluxo gênico histórico, pois possivelmente antes dos processos de fragmentações, as populações constituíam uma grande população. Apesar da distância entre as populações amostradas, existe um fluxo gênico entre elas, ou já existiu, sendo um resultado de um fluxo gênico recente ou antigo entre as populações. O menor valor de estimativa do fluxo gênico (N_m) encontrado foi entre as populações 2 e 3 ($N_m = 2.8729$) e populações 1 e 3 ($N_m = 2.9894$). Sendo maior que 1,0 o valor de estimativa do fluxo gênico (N_m) encontrado é suficiente para evitar a diferenciação entre as populações amostradas.

Os valores de dissimilaridade genética podem avaliar a distância e a proximidade dos 116 indivíduos amostrados, dados que são de extrema importância para o entendimento da estrutura dentro e entre as populações. De acordo com os valores de dissimilaridades calculados entre as populações, conforme o complemento do índice de Jaccard, os acessos que apresentaram menor proximidade foram os 4 e 66 (8%), populações 1 e 2, respectivamente, já os acessos com maior similaridade foram 73 e 74 (14%), referentes a população 2.

Os acessos que obtiveram os menores valores de dissimilaridade encontrados foram dentro da população 3, acessos 2 e 3 (47%), assim como os mais divergentes 16 e 17 (15%) pertencem ao mesmo ponto de coleta. A similaridade entre os indivíduos foi pouco influenciada pela distância, possivelmente devido ao tamanho do fragmento, pelo pequeno número de genótipos fundadores e/ou pela proximidade física entre os indivíduos. Para os indivíduos serem utilizados como matrizes de coleta de sementes, o ideal é coletar sementes de árvores que são geneticamente mais distantes, permitindo a produção de progênies geneticamente variáveis.

No dendrograma, é possível observar a formação de 13 grupos. No agrupamento alguns indivíduos foram agrupados fora de sua população original, onde é perceptível a existência de população, porém sem um agrupamento claro, com indivíduos compartilhando informações genéticas entre as populações. A maioria dos indivíduos da população 2 permaneceram agrupados em sua população original,

observando a homogeneidade, mesmo que as características estejam sendo compartilhadas entre todas as populações.

Quanto mais o valor de similaridade calculado se aproxima de 1,0, indica que as populações são geneticamente semelhantes. A população 3 apresentou o menor valor entre as populações estudadas (0,24), enquanto a população 2 apresentou o maior valor. As populações 1 e 2 são mais similares, mesmo apresentando uma distância geográfica considerável. Para a seleção de árvores para a coleta de sementes é necessário que os indivíduos apresentem uma menor similaridade entre eles.

Um grande agrupamento foi realizado com as populações 1 e 2 e outros pequenos foram formados com todas as populações, indivíduos de populações diferentes se alocaram em outras populações. O gráfico de barras plotado pelo software STRUCTURE com o método UPGMA, foi verificado que indivíduos compartilham informações genéticas de outras populações. A população 1 e 2 compartilham mais informações genéticas, quando comparadas com a população 3. Possivelmente, isso pode estar relacionado a um fato histórico, onde antes de ocorrer as fragmentações das florestas, os indivíduos ocupavam uma mesma floresta contínua.

O valor do coeficiente de correlação cofenético (CCC) para a o resumo do conjunto de dados analisados foi de 0,77 neste estudo. De acordo com Tomaz *et al.* (2020), o valor do coeficiente de correlação cofenético quando está acima de 0,7 indica que o método de agrupamento utilizado para realizar as análises foi adequado.

O estresse pode ser classificado em 5 níveis (40%, 20%, 10%, 5% e 0%) insatisfatório, regular, bom, excelente e perfeito (KRUSKAL, 1964). O valor de estresse foi considerado regular (12%) para o coeficiente avaliado, sugerindo que o método utilizado para projeção da matriz de similaridade foi adequado.

O número de alelos observados (N_a) e número de alelos efetivos (N_e) são parâmetros genéticos utilizados como ferramentas para a caracterização da diversidade genética encontrada entre ou dentro das populações e, neste estudo, os resultados obtidos variaram de 1,65 a 1,94. Os valores encontrados neste estudo

foram semelhantes aos mencionados na literatura para outras espécies arbóreas (FERNANDES, 2008).

O valor do índice de Shannon (I) pode variar de 0 – 1, sendo o valor 1 o máximo de diversidade genética que uma população pode atingir, quanto mais próximo de 0 menos diversidade a população possui (SÁNCHEZ, 2008). Neste estudo, o valor do índice de Shannon (I') variou entre 0,33 (população 3) a 0,43 (população 1). Valores semelhantes foram encontrados para a espécie *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, o popular cambará ($H'=0,38$ a $0,48$) no estudo de Abjaud *et al.* (2006).

O valor encontrado do índice de diversidade genética de Nei para a população 3 foi considerado baixo ($H'=0,22$). Esse valor pode estar relacionado a um possível plantio dos indivíduos presentes na área, provenientes de matrizes que não apresentam uma variabilidade maior. Além desse fator, o valor encontrado pode estar relacionado a fragmentação da área onde a população está inserida. Valores semelhantes podem ser observados em Costa *et al.* (2015), onde uma população de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), o valor do índice de Shannon foi igual a 0,18, indicando baixa diversidade dentro da população.

Considerando o valor total do índice de Nei e do índice de Shannon para as populações estudadas, pode se afirmar que a diversidade genética encontrada está adequada. Porém, a partir da comparação dos dois parâmetros de diversidade de Nei, é possível perceber que a população 3 apresenta valores menores de diversidade quando comparada com as populações do 1 e 2, possivelmente esse resultado pode estar relacionado ao tamanho amostral utilizado neste trabalho. Para as populações 1 e 2, o número de indivíduos amostrados foi maior que 30 indivíduos, já para a população 3, o número foi menor que 30 indivíduos.

Esses resultados podem ser observados em outros estudos com o marcador dominante ISSR para espécies arbóreas. Em Yu *et al.* (2011), foi encontrada alta diversidade genética para a espécie *Magnolia officinalis* Rehder & Wilson, sendo 0,342 para o índice de diversidade de Nei e 0,496 para o índice de Shannon. O mesmo foi encontrado para a espécie *Stylosanthes scabra* Vog., sendo 0,445 para o índice de Shannon, com 60% de diversidade genética entre as populações naturais da espécie (COSTA *et al.*, 2018). Da mesma forma, foi encontrado para a espécie *Enterolobium*

contortisiliquum, o valor de 0,384 para o índice de Shannon e 0,280 para índice de Nei (MOREIRA *et al.*, 2015).

Neste estudo a diversidade genética caracterizada dentro da população 3 foi considerada baixa, quando comparada com as outras populações (1 e 2). A hipótese que mais se adequa é que a população 3 estudada possui indivíduos plantados. Valores semelhantes foram encontrados em Ballesta *et al.* (2015), onde a análise da diversidade genética da espécie *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell., foi considerada baixa ($H' = 0,113$ a $0,268$), sendo os indivíduos plantados.

7. CONCLUSÃO

- O (DAP) e altura total (Ht) mostraram-se parâmetros dendométricos adequados para a escolha de indivíduos a serem coletados o material vegetal;
- O marcador ISSR utilizado se mostrou eficiente para o estudo de diversidade genética para a espécie *Paratecoma peroba*;
- Os dados encontrados para a população 3 indicam que possivelmente os indivíduos presentes no local são plantados, oriundos de mudas com diversidade genética baixa e similaridade baixa entre os indivíduos, não sendo indicados para a seleção de árvores matrizes;
- As três populações apresentaram estruturação populacional moderada;
- As populações 1 e 2 são áreas indicadas para seleção de árvores matrizes e posterior coleta de sementes para a produção de mudas, sendo constatada variabilidade genética adequada entre e dentro dessas populações;
- Estudos futuros envolvendo uma maior amostragem poderiam elucidar melhor a diversidade genética da população 3.

REFERÊNCIAS

- ABJAUD, R. E. *et al.* Genetic diversity in natural populations of candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, n. 70, p. 97-106., 2006.
- ABREU, K. M. P.; SILVA, G. F.; SILVA, A. D. Análise fitossociológica da Floresta Nacional de Pacotuba, Cachoeiro de Itapemirim – ES, Brasil. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 157 – 168, 2013.
- ABREU, K. M. P.; BRAGA, J. M. A.; NASCIMENTO, M. Tree species diversity of coastal lowland semideciduous forest fragments in northern Rio de Janeiro State, Brazil. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 30, n. 5, p. 1529 – 1550, 2014.
Disponível em:
<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/22018>. Acesso em: 10 abr. 2021.
- AGUIAR, M. S. Marcadores moleculares como ferramenta no melhoramento genético de plantas. *In: I Ciclo de Palestras sobre o Uso de Marcadores Moleculares na Pesquisa Agropecuária*. Brasília, DF: Embrapa, 2012.
- AMABILE, R. F.; VILELA, M. S.; PEIXOTO, J. R. **Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado**. Brasília, DF: Proimpress, 2018. 108 p. Disponível em:
https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1106825/1/Melhoramento_de_plantas.pdf. Acesso em: 10 abr. 2021.
- AMMIRAJU, J. S. S. *et al.* Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 5, p. 726-732, 2001.
- AMORIM, L. B. **Construção de um mapa genético para feijão-caupi com marcadores moleculares ISSR, DAF E CAPS**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
- ARCHANJO, K. M. P. A; SILVA, G. F.; CHICHORRO, J. F.; SOARES, C. P. B. Estrutura do componente arbóreo da Reserva Particular do Patrimônio Natural Cafundó, Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 42, n. 1. P. 145 – 160, 2012.
- BARBOSA, M. M. Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico. *In: MILACH S. (Ed.). Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: UFRGS. p.99-106, 1998.
- BARBOSA, J. F. M. **Ecofisiologia, Fenologia e Adaptação de Espécies Florestas Arbóreas nas Condições Edafoclimáticas de Viana – ES**. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

BALLESTA, P. *et al.* Analysis of the genetic diversity of *Eucalyptus cladocalyx* (sugar gum) using ISSR markers. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 37, n. 2, p. 133-140, 2015.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84781997000300026>. Acesso em: 10 abr. 2021.

BINNECK, E.; NEDEL, J. L.; DELLAGOSTIN, O. A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil?. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, pp. 183-196, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-31222002000100027>. Acesso em: 10 abr. 2021.

BOMBONATO, J. R. *et al.* Cross-genera SSR transferability in cacti revealed by a case study using *Cereus* (Cereeae, Cactaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, pp. 87-94, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0293>. Acesso em: 10 abr. 2021.

BOUZAT, J. L. The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. **Biological Conservation**, v. 99, n. 3, p. 277-284, 2001.

BOTREL, M. C. G. *et al.* Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, v. 30, p. 821-827, 2006.

BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, v. 35, n. 5, pp. 957-964, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622011000600001>. Acesso em: 10 abr. 2021.

BROWN, S. **Genetic Variation Within and Between Some Rare and Common Taxa of Cape Proteaceae and the Implications for Their Conservation**. Tese (Doutorado em Rhodes University. 1999.

COSTA, W. S.; SOUZA, A. L.; SOUZA, P. B. **Jatobá - *Hymenaea courbaril* L.: ecologia, manejo, silvicultura e tecnologia de espécies nativas da Mata Atlântica**. Viçosa: Polo de Excelência em Florestas, 2011. 21 p. Disponível em: <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/11139>. Acesso em: 10 abr. 2021.

COSTA, D. F. *et al.* Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

COSTA, J. C. *et al.* Genetic diversity in natural populations of *Stylosanthes scabra* using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 1, 2018.

COIMBRA-FILHO, A. F. Contribuição para o estudo do desenvolvimento inicial da Peroba-de-campos. **Revista Agronomia**, v. 10, n. 3, p. 187-192, 1951.

CNCFlora. **Paratecoma peroba** in **Lista Vermelha da flora brasileira**. Disponível em: http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Paratecoma_peroba. Acesso em: 2 jan. 2021.

CULLEY, T. M.; WOLFE, A. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. **Heredity**, v. 86, n. 5, p. 545-556, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00875.x>. Acesso em: 10 abr. 2021.

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

DUARTE, M. M. **Diversidade genética de populações naturais de Ziziphus joazeiro Mart. como subsídio para adoção de estratégias de conservação**. 2015. 66 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2015.

ENGEL, V. L.; MARTINS, F. R. Reproductive phenology of Atlantic Forest tree species em Brazil: an eleven-year study. **Tropical Ecology**, v. 46, n. 1, p. 1 -16, 2005.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 730 p.

FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A.; MOLINA, W. F. Conservação genética de populações naturais: Uma revisão para Orchidaceae. **Biota Amazônia**, v. 6, n. 3, p. 108-118, 2016.

FELIX, F. C. *et al.* Applications of ISSR markers in studies of genetic diversity of *Pityrocarpa moniliformis*. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 4, pp. 1017-1024, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n417rc>. Acesso em: 10 abr. 2021.

FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa – CERNAGEN, 1998, 220 p.

FERNANDES, R. C. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no Norte de Minas Gerais**. 2008. 65p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, 2008

FISCHER, M. *et al.* RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, v. 87, n. 8, p. 1128-1137, 2000.

FLORA DO BRASIL. **Paratecoma** in **Flora do Brasil**. 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB114203>. Acesso em: 10 jun. 2021.

FREITAS, E. P. *et al.* Indicadores ambientais para áreas de preservação permanente. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 4, p. 443-449, 2013.

GERRY, E. **Ipe peroba, peroba do cambo: *Paratecoma peroba* (record) Kuhlmann, family Bignoniaceae**. 1954.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae (Tribe Tecomeae). **Flora Neotropica**. **New York. Hafner Press**, v.25, n.2, p. 163-169, 1992.

GODWIN, I. D. *et al.* Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, v.18, n. 9, 1524–1528, 1997.

GODT, M. W.; HAMRICK, J. L.; BRATTON, S. Genetic diversity in a threatened wetland species, *Helonias bullata* (Liliaceae). **Conservation Biology**, v. 9, n. 3, p. 596-604, 1995.

GUIMARÃES, C. T. *et al.* Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 30, p. 24–33, 2009.

HARRIS, L. F.; JOHNSON, S. D. The consequences of habitat fragmentation for plant–pollinator mutualisms. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 24, n.1, p 29-43, 2004.

HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. **Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas**. Embrapa Algodão Documentos, 35 p., 2006.

HOCAOGLU-OZYIGIT, A. *et al.* Genetic Diversity and Phylogenetic Analyses of Turkish Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) Lines Using ISSR Markers and Chloroplast trnL-F Regions. **Journal of Natural Fibers**, p. 1–14, 2020.

HASSANEIN, A. M. A.; AL-SOGEER, A. A. (2018). Morphological and genetic diversity of *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* genotypes. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, 59(2), 251–261. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0024-0>. Acesso em: 10 abr. 2021.

IPNI. **International Plant Names Index**. Disponível em: <http://www.ipni.org>. Acesso em: 10 abr. 2021.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998. Disponível em: <http://www.lcb.esalq.usp.br/publications/articles/1998/1998stiv12n32p65-70.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2021.

KAGEYAMA, P. Y. *et al.* Genetic diversity in tropical tree species from different successional stages determined with genetic. **Scientia Forestalis**, v. 64, p. 93–107, 2003.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nometric hypothesis. **Psychometrika**, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1007/BF02289565>. Acesso em: 10 abr. 2021.

LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science**, v. 241, n. 4872, p. 1455-1460, 1988.

LINS, B. L.; NASCIMENTO, M. T. Fenologia de *Paratecoma peroba* (Bignoniaceae) em uma floresta estacional semidecidual do norte fluminense, Brasil. **Rodriguésia**, v. 61, n. 3, p. 559-568, 2010.

LORENZONI, R. M. *et al.* Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 251-257, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LOVELESS, M. D.; HMARICK, J. L. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, n.1, p. 65–95, 1984.

MATOCQ, M. D.; VILLABLANCA, F. X. Low genetic diversity in an endangered species: recent or historic pattern?. **Biological Conservation**, v. 98, n. 1, p. 61-68, 2001.

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. **CEP**, v. 38400, p. 902, 2010.

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação in situ. **IPEF**, v. 35, p. 71-78, 1987.

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

MOREIRA, P. A. *et al.* Genetic diversity and structure of the tree *Enterolobium contortisiliquum* (Fabaceae) associated with remnants of a seasonally dry tropical forest. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 210, p. 40-46, 2015.

NADEEM, M. A. *et al.* Marcadores moleculares de DNA no melhoramento de plantas: estado atual e avanços recentes na seleção e edição do genoma. **Biotecnologia e Equipamentos Biotecnológicos**, v. 32, n. 2, p. 261-285, 2018.

- NEVES, E. S.; WADT, L. H. O.; GUEDES, M. C. Estrutura populacional e potencial para o manejo de *Bertholletia excelsa* (Bonpl.) em castanhais nativos do Acre e Amapá. **Embrapa Rondônia-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016.
- NEWSTROM, L. E. *et al.* A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. **Biotropica**, v. 26, p. 141-159, 1994.
- NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular ecology**, v. 13, n. 5, p. 1143-1155, 2004.
- OLMSTEAD, R. G. *et al.* A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 9, p. 1731–1743, 2009.
- PINHEIRO, L. Z. **Avaliação do perfil químico e quantificação do potencial antioxidante e antibacteriano da espécie ameaçada de extinção *Paratecoma peroba* (Record e Mell) Kuhlm (peroba do campo)**. 2014. 137 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2014.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959. 2000.
- PRECZENHAK, A. P. **Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate**. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Centro-Oeste. Guarapuava, 2013.
- POMPER, K. W. *et al.* Assessment of genetic diversity of pawpaw (*Asimina triloba*) cultivars with intersimple sequence repeat markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 4, p. 521-525, 2003.
- RAMALHO, A. B. *et al.* Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Floresta**, v. 46, n. 2, p. 207-214, 2016.
- RAPOSO, A. **Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. Meliaceae) visando o manejo e a conservação da espécie**. 2007. 151 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, 2007.
- REGITANO, L. C. A. Introdução à análise de marcadores moleculares. *In*: REGITANO, L.C. de A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.25-39, 2001.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9 – 17, 2002.
- ROLDAN-RUIZ, I. *et al.* AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, n. 6, p.125–134, 2000.

SÁNCHEZ, C. F. B. **Diversity among and within populations under simulated genetic drift**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Genética animal; Genética molecular e de microrganismos; Genética quantitativa; Genética vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

SIMONELLI, M.; FRAGA, C. N. **Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo**. Vitória, ES: IPEMA, 2007. 144 p.

SILVA, G.C.; NASCIMENTO, M.T. Fitossociologia de um remanescente de mata sobre tabuleiros no norte do estado do Rio de Janeiro (Mata do Carvão). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p 51-62, 2001.

SILVA, M. G. C.; MARTINI, A. M. Z.; ARAÚJO, Q. R. Estrutura populacional de *Euterpe edulis* Mart. no sul da Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, n. 2, p. 393-403, 2009.

SILVA, A. V. C. *et al.* Diversidade e estrutura genética de acessos brasileiros de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, n. 5, p. 387-393, out. 2014.

SILVA, R. D.; SANTOS, L. N.; ABREU, K. M. P.; FERRARI, J. L. Mapeamento de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlm. em um fragmento de floresta estacional semidecidual no sul do Espírito Santo. **Anais do III Encontro de Ciências Biológicas**, Alegre, ES, 2016.

SLATKIN, M.; BARTON, N.H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, v. 43, p.1349-1368, 1989.

TANSLEY, S. A.; BROWN, C. R. RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): implications for their conservation. **Biological Conservation**, v. 95, n. 1, p. 39-48, 2000.

TIKUNOV, Y. M. *et al.* Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*. **Euphytica**, v. 131, n. 1, p. 71-81, 2003.

THIAGO, C. R. L.; MAGALHÃES, I. A. L.; SANTOS, A. R. Identificação de Fragmentos Florestais Potenciais para a delimitação de Corredores Ecológicos na bacia hidrográfica do Rio Itapemirim, ES por meio técnicas de Sensoriamento Remoto. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 13, n. 2, p. 595–612, 2020.

TOMAZ, F.L. S. *et al.* Coeficientes de similaridade para avaliação da diversidade genética em pinhão-mansão por marcadores ISSR. **Nativa**, v. 8, n. 4, p. 456-463, 2020.

VIANNA, L. S., *et al.* ISSR and SSR markers for determining genetic relationships among three wild species of *Passiflora*. **Genetics and Molecular Research**, v.18, n. 1, 2019.

VIEIRA, A. A. R. *et al.* Genetic structure and diversity of *Senefeldera verticillata* (Euphorbiaceae) in semideciduous seasonal forest fragments. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 3, 2018.

VILLELA, D.M. *et al.* Effect of selective logging on forest structure and nutrient cycling in a seasonally dry Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 33, p. 506-516, 2006.

WOLFE, A. D. *et al.* Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 9, p. 1107-1125, 1998.

WOLFE, A. D. ISSR Techniques for Evolutionary Biology. **Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data**, 134–144, 2005. Disponível em: [https://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(05\)95009-x](https://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(05)95009-x). Acesso em: 10 jun. 2021.

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**, v. 129, p.156-157, 1999.

YU, Hua-Hui *et al.* Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis* (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 2, p. 71-78, 2011.

ZOLET, A. C. T. *et al.* Marcadores Moleculares na Era genômica: **Metodologias e Aplicações**. Sociedade Brasileira de Genética, 2017.

APÊNDICE A. Caracterização dos 116 indivíduos selecionados de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. para coleta de material vegetal e análise molecular. DAP: Diâmetro à altura do peito; Ht: Altura Total; Coord: Coordenadas; Alt.: altura; C. luminosidade: Condição de Luminosidade.

(Continua)

Nº	DAP	Ht	Coord.	Alt.	C.	Vigor	Flores	Frutos
Indivíduo	(cm)	(m)		(m)	luminosidade			
1	34	12,5	24K0243311 7701970	150	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
2	45,25	30	24K0242849 7701940	211	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
3	26	20	24K0242816 7701968	230	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
4	32	30	24K0243030 7701840	169	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
5	35	18	24K0242990 7701828	171	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
6	47,5	20	24k0242860 7701789	205	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
7	47	23	24k0242906 7701785	221	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
8	30,5	25	24k0242908 7701760	227	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
9	16	15	24k0242902 7701755	231	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
10	49	20	24K0243081 7701734	189	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
11	50	22	24K0243051 7701750	199	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
12	16	14	24K0243031 7701750	196	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
13	3,75	6	24K0243052 7701677	216	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
14	16	10	24K0243051 7701676	215	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
15	5,48	3	24K0243054 7701680	215	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
16	15	12	24K0243047 7701680	219	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
17	26	14	24K0243059 7701681	224	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
18	10	6,5	24K0243066 7701675	226	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
19	47	28	24K0242787 7701903	225	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência

APÊNDICE A. Caracterização dos 116 indivíduos selecionados de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. para coleta de material vegetal e análise molecular. DAP: Diâmetro à altura do peito; Ht: Altura Total; Coord: Coordenadas; Alt.: altura; C. luminosidade: Condição de Luminosidade.

(Continuação)

Nº Indivíduo	DAP (cm)	Ht (m)	Coord.	Alt. (m)	C. luminosidade	Vigor	Flores	Frutos
20	59	32	24K0242738	238	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7701934					
21	63	36	24K0242706	251	Clareira	Saudável	Presença	Ausência
			7701969					
22	44	39	24K0242739	243	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7701977					
23	60	32	24K0242772	257	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7701993					
24	49	28	24K0242765	258	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7701990					
25	11	7	24K0242356	409	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701815					
26	10	7	24K0242355	410	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701814					
27	6	7	24K0242354	410	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701810					
28	2,5	2	24K0242366	411	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701818					
29	9	7	24K0242355	410	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701813					
30	4,5	3,5	24K0242364	410	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701821					
31	4	4	24K0242360	410	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701813					
32	7	4	24K0242362	410	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701818					
33	3	2	24K0242361	415	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701812					
34	5	4	24K0242361	414	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701811					
35	8	7	24K0242361	414	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701813					
36	3	3	24K0242361	414	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701818					
37	4,5	3	24K0242364	415	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701814					
38	5	3,5	24K0242362	411	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701820					
39	5	2	24K0242365	411	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701820					
40	2	2	24K0242367	412	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701821					
41	3,5	3	24K0242371	412	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701823					
42	7	5	24K0242369	412	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701814					

APÊNDICE A. Caracterização dos 116 indivíduos selecionados de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. para coleta de material vegetal e análise molecular. DAP: Diâmetro à altura do peito; Ht: Altura Total; Coord: Coordenadas; Alt.: altura; C. luminosidade: Condição de Luminosidade.

(Continuação)

Nº Indivíduo	DAP (cm)	Ht (m)	Coord.	Alt. (m)	C. luminosidade	Vigor	Flores	Frutos
43	2	8	24K024373	415	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701817					
44	2	2	24K0242371	418	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701816					
45	1	1,5	24K0242368	416	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701815					
46	3	4,5	24K0242371	416	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701810					
47	2,25	3	24K0242375	415	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701812					
48	6	8	24K0242369	415	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701810					
49	5	5,5	24K0242368	414	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701809					
50	2,66	3	24K0242373	414	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701809					
51	4	5	24K0242360	414	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701812					
52	4	4	24K0242356	413	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701809					
53	4	2,5	24K0242364	414	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701810					
54	3	4	24K0242365	418	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701812					
55	8	7	24K0242363	413	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701813					
56	3	3	24K0242364	415	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701808					
57	20	25	24K0242776	241	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701850					
58	26	35	24K0242684	255	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701845					
59	25	21	24K0242678	263	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7701844					
60	38	54	24K0242697	258	Borda	Saudável	Presença	Ausência
			7701881					
61	38	55,5	24K0242747	248	Borda	Saudável	Presença	Ausência
			7701819					
62	8	7,5	24K0243025	226	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7702122					
63	4	3,5	24K0243010	232	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
			7702121					
64	30	30	24K0243012	240	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7702109					

APÊNDICE A. Caracterização dos 116 indivíduos selecionados de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. para coleta de material vegetal e análise molecular. DAP: Diâmetro à altura do peito; Ht: Altura Total; Coord: Coordenadas; Alt.: altura; C. luminosidade: Condição de Luminosidade.

(Continuação)

Nº Indivíduo	DAP (cm)	Ht (m)	Coord.	Alt. (m)	C. luminosidade	Vigor	Flores	Frutos
65	40	75	24K0263223	77	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7704963					
66	30	39	24K0263218	92	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7704979					
67	42	96	24K0261252	95	Borda	Saudável	Presença	Ausência
			7704400					
68	52,5	40	24K0261272	100	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7704394					
69	30	40	24K0261267	95	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7704405					
70	32	80,5	24K0261212	92	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7704432					
71	3	4,5	24K0261211	102	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7704420					
72	30	78	24K0261333	119	Borda	Saudável	Presença	Ausência
			7704562					
73	32	30	24K0261337	123	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7704534					
74	34	44	24K026341	116	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7704531					
75	34	39	24K0261343	117	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7704532					
76	42	73,5	24K0261341	104	Clareira	Saudável	Presença	Ausência
			7704503					
77	32	32	24K0261339	108	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
			7704509					
78	1,5	2	24K0261307	106	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7704551					
79	28	52	24K0261330	105	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
			7704517					
80	30	59	24K0261210	119	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
			7704439					
81	32	90	24K0261089	129	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
			7704386					
82	32	43	24K0260891	103	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7704473					
83	30	55	24K0260885	103	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7704469					
84	30	35	24K0260879	90	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
			7704459					
85	32	82	24K0261555	109	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7704702					
86	34	51	24K0261467	109	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
			7704698					
87	40	88	24K0260955	91	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7705070					

APÊNDICE A. Caracterização dos 116 indivíduos selecionados de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhlm. para coleta de material vegetal e análise molecular. DAP: Diâmetro à altura do peito; Ht: Altura Total; Coord: Coordenadas; Alt.: altura; C. luminosidade: Condição de Luminosidade.

(Continuação)

Nº Indivíduo	DAP (cm)	Ht (m)	Coord.	Alt. (m)	C. luminosidade	Vigor	Flores	Frutos
88	38	95	24K0260643 7705107	96	Pasto	Saudável	Ausência	Ausência
89	35	99	24K0260891 7704432	81	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
90	25	24,5	24K0260849 7704370	95	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
91	40	59	24K0260816 7704307	95	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
92	20	28	24K0262204 7704424	89	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
93	32	43	24K0262191 7704449	90	Interior da floresta	Saudável	Ausência	Ausência
95	25	35	24K0262230 7704425	101	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
96	20	34	24K0361916 7703389	98	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
97	20	39	24K0244446 7703127	152	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
98	30	72,5	24K0244450 7703131	151	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
99	21	20	24K0244441 7703130	153	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
100	26	55	24K0244449 7703135	154	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
101	30	45	24K0244439 7703128	146	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
102	30	50	24K0244429 7703132	146	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
103	25	29	24K0244434 7703131	148	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
104	23	18	24K0244432 7703122	143	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
105	27	24	24K0244424 7703109	143	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
106	20	28	24K0244424 7703111	139	Clareira	Saudável	Ausência	Ausência
107	18	20	24K0244425 7703180	140	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
108	26	20	24K0244426 7703111	141	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
109	30	36	24K0244433 7703103	138	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
110	20	24	24K0244439 7703102	143	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
111	29	25	24K0244441 7703092	140	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
112	18	19	24K0244441 7703099	142	Borda	Saudável	Ausência	Ausência

APÊNDICE A. Caracterização dos 116 indivíduos selecionados de *Paratecoma peroba* (Record) Kuhl. para coleta de material vegetal e análise molecular. DAP: Diâmetro à altura do peito; Ht: Altura Total; Coord: Coordenadas; Alt.: altura; C. luminosidade: Condição de Luminosidade.

(Conclusão)

Nº Indivíduo	DAP (cm)	Ht (m)	Coord.	Alt. (m)	C. luminosidade	Vigor	Flores	Frutos
113	23	24	24K0244435	139	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7703101					
114	22	38	24K0244422	143	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7703117					
115	28	32	24K0244421	143	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7703119					
116	24	35	24K0244424	145	Borda	Saudável	Ausência	Ausência
			7703119					