

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

THOMÁZ DA SILVA GUERREIRO BOTELHO

**Diversidade genética e fragmentação de habitats naturais de
Aspidosperma quebracho-blanco Schltdl. (APOCYNACEAE), questões
para conservação em vegetações de Chaco e Savana Estépica**

Campo Grande – MS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

THOMÁZ DA SILVA GUERREIRO BOTELHO

**Diversidade genética e fragmentação de habitats naturais de
Aspidosperma quebracho-blanco Schldl. (APOCYNACEAE), questões
para conservação em vegetações de Chaco e Savana Estépica**

Dissertação apresentada como um dos
requisitos para obtenção do grau Mestre
em Biologia Vegetal junto ao Instituto de
Biociências

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Ana Farinaccio – UFMS/CPAN

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Gecele Matos Paggi – UFMS/CPAN

Campo Grande – MS

2019

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, nome pelo qual me direcionei até aqui.

Aos meus pais, Ana Paula da Silva e Heribaldo G. Botelho, fontes de amor e sabedoria.

A minha querida Selma Rodrigues Costa, por seu carinho, confiança, alegria e o seu “SIM” para o nosso amor.

A Dilma Guerreiro Botelho, minha segunda mãe, pelas inúmeras vezes que partilhou sua sabedoria.

Aos meus eternos amigos Alessandra, André, Floriano, Francisco, Lucas, Mayara e Romário e aos demais envolvidos com o meu desenvolvimento pessoal.

Aos meus familiares que me apoiaram em estadias, incentivo e amor incondicional.

Ao senhor Célio, dona Roseli, Célia e Kátia, por me acolherem em sua família.

Às professoras Gecele Matos Paggi e Maria Ana Farinaccio, pela orientação segura, confiança e oportunidades oferecidas.

Aos meus colegas do Laboratório de Botânica Graziela Maciel Barroso, onde iniciei meus estudos e até hoje levo boas recordações.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética do Campus do Pantanal, local onde me especializei e criei boas experiências.

Ao Laboratório de Ecologia Molecular e Genômica Evolutiva de Plantas da UNICAMP, especialmente a professora responsável Clarisse Palma da Silva, que não mediu esforços para auxiliar na realização deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Estudos Socioambientais do Campus do Pantanal.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelos conhecimentos adquiridos durante estes dois anos de formação.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundect, pelo apoio financeiro a este Projeto.

Sumário

Normas da Revista Brazilian Journal of Botany	3
Resumo	6
Abstract	7
1. INTRODUÇÃO GERAL	6
1.1 Diversidade genética e georreferenciamento de populações naturais	6
1.2 Apocynaceae	7
1.2.1 <i>Aspidosperma</i> Mart. & Zucc.	8
1.2.2 <i>Aspidosperma quebracho-blanco</i> Schltl.	9
1.3 Formações de Chaco	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
4. Normas da Forests — Open Access Journal para submissão de artigos científicos	19
4.1 ARTIGO	22
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63

Normas da Revista *Brazilian Journal of Botany*

A introdução geral aqui apresentada não foi submetida, porém está de acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, cujos critérios seguem a Revista *Brazilian Journal of Botany*.

Citar cada figura e tabela no texto em ORDEM NUMÉRICA CRESCENTE.

Colocar as citações bibliográficas de acordo com os exemplos: Smith (1960) / (Smith 1960); Smith (1960, 1973); Smith (1960a, b); Smith & Gomez (1979) / (Smith & Gómez 1979); Smith et al. (1990) / (Smith et al. 1990); (Smith 1989, Liu & Barros 1993, Araujo et al. 1996, Sanches 1997).

Em trabalhos taxonômicos, detalhar as citações de material botânico, incluindo ordenadamente: local e data de coleta, nome e número do coletor e sigla do herbário, conforme os modelos a seguir: BRASIL. MATO GROSSO: Xavantina, s.d., H.S. Irwin s.n. (HB3689). SÃO PAULO: Amparo, 23-XII-1942, J.R. Kuhlmann & E.R. Menezes 290 (SP); Matão, ao longo da BR 156, 8-VI-1961, G. Eiten et al. 2215 (SP, US).

Nos demais tipos de trabalhos os materiais-testemunho devem ser referidos.

Os nomes de autores de táxons de plantas vasculares devem ser abreviados seguindo Brummit & Powell (1992), colocando espaços após cada ponto, como ex.: *Brassica nigra* (L.) W. D. J. Koch. O(s) nome(s) do(s) autor(es) em nível de espécie ou abaixo deve(m) ser citado(s) no Abstract e na primeira vez que aparece(m) no texto e opcionalmente no título.

Abreviaturas de obras em trabalhos taxonômicos devem seguir o BPH.

Citar referências a resultados não publicados ou trabalhos submetidos da seguinte forma: (S.E. Sanchez, unpublished data)

Citar números e unidades da seguinte forma:

- Escrever números até nove por extenso, a menos que sejam seguidos de unidades ou indiquem numeração de figuras ou tabelas.

- Separar as unidades dos valores por um espaço (exceto para porcentagens ou para graus, minutos e segundos de coordenadas geográficas); utilizar abreviações sempre que possível.

- Utilizar, para unidades compostas, exponenciação e não barras (Ex.: mg day⁻¹ nunca mg/day, $\mu\text{mol min}^{-1}$ nunca $\mu\text{mol/min}$). Não inserir espaços para mudar de linha, caso a unidade não caiba na mesma linha. Não inserir figuras no arquivo do texto.

Referências bibliográficas: Adotar o formato apresentado nos seguintes exemplos:

Zar JH. 1999. Biostatistical analysis. 4th ed., Prentice Hall, Upper Saddle River.

Yen AC, Olmstead RG. 2000. Phylogenetic analysis of *Carex* (Cyperaceae): generic and subgeneric relationships based on chloroplast DNA. *In* Monocots: systematics and evolution (KL Wilson, DA Morrison, eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, p.602-609.

Bentham G. 1862. Leguminosae. Dalbergiae. *In* Flora brasiliensis (CFP Martius, AG Eichler, eds.). F. Fleischer, Lipsiae, v.15, pars 1, p.1-349.

Döbereiner J. 1998. Função da fixação de nitrogênio em plantas não leguminosas e sua importância no ecossistema brasileiro. *In* Anais do IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros (S Watanabe, coord.). Aciesp, São Paulo, v.3, p.1-6.

Farrar JF, Pollock CJ, Gallagher JA. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154:1-11.

Punt W, Blackmore S, Nilsson S, Le Thomas A. 1999. Glossary of pollen and spore terminology. <http://www.biol.ruu.nl/~palaeo/glossary/glosint.htm> (accessed 2003 Apr 10).

Tabelas

Usar os recursos de criação e formatação de tabela do Word for Windows. Evitar abreviações (exceto para unidades).

Colocar cada tabela em página separada e o título na parte superior conforme exemplo:

Table 1. Total flavonoids and total phenol production (% of dry mass) in leaves of *Pyrostegia venusta*.

Não inserir linhas verticais; usar linhas horizontais apenas para destacar o cabeçalho e para fechar a tabela.

Figuras

Enviar ilustrações em pranchas (fotos ou desenhos, gráficos, mapas, esquemas) no tamanho máximo de 23,0 × 17,5 cm, incluindo preferencialmente o espaço necessário para a legenda. Não serão aceitas figuras que ultrapassem o tamanho estabelecido ou que apresentem qualidade gráfica ruim. Figuras devem ser geradas com pelo menos 600 dpi de resolução, salvas no programa utilizado (CorelDraw, Photoshop) e, também, em .tif e nunca devem ser coladas no MS Word ou no Power Point. Gráficos ou outras figuras que possam ser publicados em uma única coluna (8,5 cm) serão reduzidos; atentar, portanto, para o tamanho de números ou letras, para que continuem visíveis após a redução. Tipo e tamanho da fonte, tanto na legenda quanto no gráfico, deverão ser os mesmos utilizados no texto. Gráficos e figuras confeccionados em planilhas eletrônicas devem vir acompanhados do arquivo com a planilha original. Colocar cada prancha em página separada e o conjunto de legendas das figuras, sequencialmente, em outra(s) página(s). Utilizar escala de barras para indicar tamanho. A escala, sempre que possível, deve vir à esquerda da figura; o canto inferior direito deve ser reservado para O(S) NÚMERO(S) DA(S) FIGURA(S). Letras devem ser utilizadas somente para legenda interna. O não cumprimento de todas as exigências acima, referentes ao envio das figuras/imagens, poderá implicar em má qualidade na impressão final e nestes casos o comitê editorial poderá decidir pela rejeição, mesmo de manuscritos anteriormente aceitos. Sempre que houver dúvida consulte o fascículo mais recente da RBB. O trabalho somente receberá data definitiva de aceite após aprovação pelo Corpo Editorial, tanto em relação ao mérito científico quanto ao formato gráfico. Para maiores informações enviar e-mail para rbbot@ig.com.br

Resumo

As atividades de intensa retirada de madeira de *Aspidosperma quebracho-blanco* fazem parte de um passado marcado pela economia extrativista do Chaco, sucedendo na redução de boa parte dos quebrachais. É uma espécie tradicionalmente conhecida pelo uso medicinal no tratamento de malária, propriedades antiasmáticas e reconhecida por estudos químicos pela presença de alcaloides em sua casca. A madeira também possui atributos que a tornaram uma ótima opção para confecção de carpintaria e fabricação de carvão. Nesse contexto, ações que visam apontar novas direções para a gestão das populações naturais da espécie são extremamente necessárias. O presente estudo teve como objetivo conhecer a diversidade genética da espécie com o intuito de subsidiar estratégias de conservação nos habitats fragmentados da espécie. Para o seu desenvolvimento foram realizadas expedições de coleta em toda área de distribuição conhecida (Argentina, Brasil e Paraguai). Os 25 indivíduos, provenientes de cinco populações, foram georreferenciados e posicionados nos arquivos *shapefile* contendo as fitofisionomias de Chaco e Savana Estépica para identificação de habitats fragmentados. Para descrever a diversidade genética foram utilizados seis marcadores do tipo ISSR, que apresentaram o maior número de fragmentos, boa resolução e caráter mais informativo, após os testes iniciais. Os valores de coeficiente da matriz de similaridade obtidos entre as populações variaram entre 0,26 e 0,55, diferentemente dos encontrados entre os indivíduos (0,0 e 0,77). Já as médias de diversidade genética foram baixas e variaram de forma gradativa, variando entre 0,09 e 0,15 para o índice de Shannon (H'), e de 0,19 a 0,31 na diversidade de Nei (N_e), registros coincidentes com padrões de conteúdo de informação polimórfica (PIC). Quanto a distribuição das populações, evidenciou-se impactos ambientais na região norte do Chaco e na Savana Estépica, locais onde está localizada a maioria das populações amostradas. A autocompatibilidade e os efeitos da fragmentação florestal podem ser os principais responsáveis pela redução da heterozigose e da diversidade genética da espécie. Os resultados obtidos nas análises também sugerem que as populações mais próximas sejam menos divergentes, principalmente nos ambientes de Chaco Árido, onde anemocoria é facilitada. O histórico de perturbações nos fragmentos em que as populações estão localizadas podem torná-las mais vulneráveis aos efeitos de deriva genética, endogamia e efeito de borda, comprometendo também as mais de 200 espécies de insetos associadas a *A. quebracho-blanco*. Vale ressaltar que as populações de áreas áridas, com condições climáticas adversas, podem ter estabelecimento de mudas comprometido, condição indispensável para coleta de germoplasma em áreas adequadas. Desse modo, os resultados obtidos apontam uma grande ameaça à conservação dos recursos genéticos de *A. quebracho-blanco*, havendo necessidade de unidades de conservação e criação de novos bancos de germoplasma contendo material genético oriundos de fragmentos mais conservados.

Palavras-chave: autocompatibilidade; Chaco; espécies ameaçadas; ISSR; marcadores moleculares.

Abstract

The activities of intense wood removal of *Aspidosperma quebracho-blanco* are part of a past marked by the extractive economy of the Chaco. It is a species traditionally known for its medicinal use in the treatment of malaria, and anti-asthmatic properties, recognized by chemical studies of the presence of alkaloids in their bark. Wood also has attributes that makes it a great option for woodwork and charcoal fabrication. In this context, actions that aimed to point out new directions for natural population's management and conservation are extremely necessary. This work aimed to estimate the specie genetic diversity in fragmented populations of *A. quebracho-blanco*, with the purpose of subsidizing conservation strategies. Plant sampling were carried out in every known distribution area (Argentina, Brazil and Paraguay). Twenty-five individuals, from five populations, were collected and georeferenced, each sampled area was positioned in the shapefile files containing the Chaco and Savana Estépica phytophysionomies to identify fragmented habitats. To describe the genetic diversity, six nuclear ISSR primers were used, which presented the primers with the highest number of fragments, good resolution and more informative characters, after initial tests. The coefficient values of the similarity matrix obtained between the populations varied from 0.26 to 0.55, differently from those found among individuals (0.0 and 0.77). The genetic diversity averages were low and ranged from 0.09 to 0.15 for the Shannon index (H') and from 0.19 to 0.31 for Nei (N_e) diversity index, proportionally related to the polymorphic information content (PIC). The sampled populations are distributed in the northern Chaco and Savane Steppique areas that present different levels of environmental impact. Self-compatibility and the effects of forest fragmentation may be responsible for the reduction of heterozygous and genetic diversity of the species. The results obtained also suggest that the closest populations are less divergent, especially in environments where seed dispersal is facilitated. The history of disturbances in the fragments in which the populations are located may make them more vulnerable to genetic drift effects, endogamy and border effect, also compromising more than 200 species of insects associated with *A. quebracho-blanco*. It is worth emphasizing that in plant populations from arid areas, that have adverse weather conditions, may have the establishment of seedlings compromised, which is an indispensable condition for the collection of germplasm in suitable areas. Thus, the results obtained indicate a great threat to the conservation of *A. quebracho-blanco* genetic resources, requiring conservation units and the creation of new germplasm banks containing genetic material from more conserved and representative fragments.

Keywords: Chaco; endangered species; ISSR; self-compatibility.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Diversidade genética e georreferenciamento de populações naturais

De forma geral, a ferramenta básica usada para estudos de variabilidade genética entre e dentro de populações é a utilização de marcadores moleculares. Sua aplicação permite determinar quais alelos estão presentes, com a possibilidade de estimar o fluxo gênico e a estrutura genética populacional, torna-se importante também na produção de mapas genéticos e para a biologia da conservação. Assim sendo, esses recursos são importantes para elucidar e maior compreensão da história evolutiva das espécies (Conner & Hartl 2004, Borém & Caixeta 2009).

Estudos de populações naturais realizados em diferentes fitofisionomias têm adotado os marcadores moleculares ISSR com o objetivo de fornecer informações sobre a manutenção da variabilidade genética; sua aplicação em qualquer espécie, sem exigência de sequenciamento prévio, e seu número significativo de sequências polimórficas nos produtos amplificados, ampliaram a visibilidade deste marcador na busca de resultados que possam oferecer subsídios para conservação de populações naturais (Nagaoka & Ogihara 1997, Faleiro 2007).

A entrada da computação de comparações espaciais permitiu que fossem inseridas novas variáveis aos estudos de genética de populações, passando a considerar padrões como a distribuição de genótipos, variação geográfica de caracteres morfológicos e frequências gênicas aos estudos de conservação (Sokal & Oden 1978). Com a adoção de pressupostos provenientes de análises espaciais (Heywood 1991, Slatkin & Arter 1991, Epperson 1997), novas formulações foram inseridas aos trabalhos que utilizavam estritamente as análises de diversidade e estruturação genética para estimar a distribuição da variabilidade genética, porcentagem de locos polimórficos, número de alelos por loco e heterozigosidade média das populações (Telles et al. 2001).

O uso de comparações espaciais permitiu uma análise mais eficiente para descrever a variabilidade genética e posicionamento geográfico de populações (Epperson & Allard, 1989, Telles et al. 2001), permitindo que os pesquisadores pudessem avaliar os padrões espaciais da variação genética em populações naturais, inferindo a respeito de prováveis processos evolutivos que podem estar agindo na diferenciação genética dessas populações (Slatkin & Arter 1991, Epperson 1997).

Diante das atuais ferramentas disponíveis, os estudos de associação entre a fragmentação e a estrutura genética de populações naturais se fortaleceu nas últimas

duas décadas, acrescentando inúmeros dados para se compreender os impactos gerados na diversidade genética em ambientes ameaçados pelas ações antrópicas. Também foram definidos novos parâmetros para os programas de conservação, estabelecendo ações consideradas prioritárias a fim de garantir a sustentabilidade das populações das espécies existentes em fragmentos. Desse modo, a conservação pode ser potencializada por enriquecimento genético mais eficiente (Kageyama et al. 1998; Rocha 2006, Avise 2010).

1.2 Apocynaceae

Para se chegar ao que se conhece hoje por Apocynaceae Juss., cuja a ordem é Gentianales (APG IV 2016), muitas classificações foram realizadas. Após delimitações controvertidas, somente com os estudos de sistemática filogenética (Judd et al. 1994), especialmente moleculares (Endress et al. 1996; Sennblad & Bremer 1996, 2002, Potgieter & Albert 2001), que Endress & Bruyns (2000) apresentaram a família distribuída em cinco subfamílias até então reconhecidas: Rauvolfioideae Kostel, Apocynoideae Burnett, Periplocoideae R.Br., Secamonoideae Endel. e Asclepiadoideae R.Br. ex Burnett.

Apocynaceae contém espécies que são vastamente disseminadas em regiões tropicais e subtropicais e apresenta poucos gêneros que ocorrem nas regiões temperadas. Atualmente, possui aproximadamente 400 gêneros e 5000 espécies (Rapini 2012, Endress et al. 2014). No Brasil, somente Secamonoideae e Periplocoideae não estão representadas, mas ainda assim, o país abriga 754 espécies pertencentes a 77 gêneros, habitando todos os domínios fitogeográficos e com ampla distribuição em todos eles, principalmente no domínio da Mata Atlântica, onde a família se mostra mais diversa, contando com 367 espécies (BFG 2015).

Apocynaceae está entre as famílias que possuem grande utilidade econômica, destacando-se pela contribuição fotoquímica, no fornecimento de glicosídeos cardiotônicos, alcaloides, antibióticos, bem como na produção de sucos, polpas, geleias e de madeiras, com ênfase também para suas plantas ornamentais (Rizzini & Mors 1995), dentre elas *Stapelia hirsuta* L. “cacto estrela” e *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. e Schult. “rosa do deserto”. Além disso, as principais substâncias extraídas das espécies de Apocynaceae são a leucocristina e a vincristina, encontradas em *Catharanthus roseus* (L.) G.Don, substâncias utilizadas para o tratamento de câncer (Rizinni & Mors 1995, Vega-Ávila et al. 2006).

1.2.1 *Aspidosperma* Mart. & Zucc.

Entre os gêneros neotropicais de Apocynaceae, *Aspidosperma* Mart. & Zucc. possui aproximadamente 70 espécies, ocorrendo desde o México até a Argentina. Para o Brasil, o número de espécies reconhecidas é de aproximadamente 50, a maioria de ocorrência em áreas de floresta, porém também são encontradas em áreas de cerrado, campo, caatinga e restinga (Marcondes-Ferreira & Kinoshita 1996, Kinoshita 2005, Koch et al. 2012). Em Mato Grosso do Sul foram encontradas 15 espécies (Farinaccio & Simões 2018). Este número difere das 13 registradas na Lista de Espécies da Flora do Brasil (Flora do Brasil 2020), devido à identificação de exsicatas relativas a três espécies (*A. discolor* A.DC., *A. nobile* Müll.Arg. e *A. riedelli* Müll.Arg.), até então não citadas para o Estado, e pela exclusão de *A. pyricollum*, uma vez que o material atribuído a esta espécie corresponde, de fato, à *A. australe* Müll.Arg.

Assim como a família a qual pertence, *Aspidosperma* possui delimitações melhor definidas após estudos filogenéticos, elevando-o na subfamília Rauvolfioideae Kostel. e posicionado na tribo Aspidospermeae Miers, juntamente a cinco outros gêneros: *Geissospermum* Allemão, *Haplophyton* A. DC., *Microplumeria* Baill., *Strempeleopsis* Benth. e *Vallesia* Ruiz & Pav. (Simões et al. 2007, Endress et al. 2014). Uma das distinções do gênero está na sua relevância nas formações de Chaco, Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga (IBGE 1992), abundantemente representado por árvores ou arvoretas (Woodson 1951).

A maioria das espécies do gênero são objetos de diversas investigações na busca de novas substâncias com atividades biológicas (Di Stasi & Hiruma-Lima 2002). No Brasil, o estudo de Gilbert (1966) com 33 espécies de *Aspidosperma* nativas resultou no isolamento de mais de 100 alcaloides indólicos, o que levou a conclusão da predominância desta classe de alcaloides neste gênero. Posteriormente, após um vasto levantamento das estruturas de alcaloides identificados em espécies de *Aspidosperma*, Pereira et al. (2007) observaram uma diversidade estrutural de 247 alcaloides indólicos para o gênero. *Aspidosperma* também apresenta espécies com potencial uso na arborização, paisagismo e reflorestamento, assim como, o fornecimento de madeira para carpintaria e construção civil (Lorenzi 1992, 1998).

Estudos genéticos com espécies de *Aspidosperma*, especialmente com *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg., tratam principalmente de efeitos da fragmentação de habitats naturais e distâncias geográficas entre populações (Torezan et

al. 2005, Damasceno 2011, Zimback et al. 2011, Santos 2016). As propriedades e utilidades da madeira de *Aspidosperma polyneuron* (Carvalho 1994, Paula & Alves 1997) são bem requisitadas no mercado, indicando a necessidade de estratégias em programas de conservação e melhoramento (Sato et al. 2008). Essas informações trouxeram um outro enfoque para o gênero, servindo de premissa para o desenvolvimento e uso de distintos marcadores moleculares, com possibilidades até mesmo para transferibilidade heteróloga (Torezan et al. 2005, Damasceno 2011, Ferreira-Ramos et al. 2011, Zimback et al. 2011).

1.2.2 *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlttdl.

Aspidosperma quebracho-blanco Schlttdl. (Figura 1) nomeia a secção *Pungentia* (Pichon) Mar.-Ferr., secção facilmente distinta das demais, mesmo em estado vegetativo, agrupa espécies que possuem as folhas com ápices pungentes, únicas no gênero. A espécie arbórea é perenifólia, esclerofítica e domina o Chaco Árido (Morello et al. 1985). Embora conspícua nesta região fitogeográfica, pode ser encontrada adentrando nos ecótonos de Espinal próximos à Argentina, sendo a mais frequente das quatro espécies de *Aspidosperma* encontradas na região (Meyer 1947, Ezcurra 1981). No Brasil, *A. quebracho-blanco*, até o início do século XXI, tinha ocorrência conhecida apenas para MS, sendo somente reconhecida e registrada após estudos de vegetação e aspectos ecológicos do Parque Estadual do Espinilho, Barra do Quaraí, Rio Grande do Sul (Galvani & De Moura 2003).

O “quebracho blanco” ou simplesmente “quebracho”, como *A. quebracho-blanco* é conhecida, possui um passado marcado pela economia extrativa por volta dos anos 30 aos 50 do século XX, onde houveram atividades de intensa retirada de madeira em quebrachais. A exploração era tão promissora que funcionavam no Paraguai quatro grandes indústrias de produção de tanino extraído da madeira (Corrêa e Corrêa 2009).

Aspidosperma quebracho-blanco também é tradicionalmente conhecida pelo uso medicinal no tratamento de malária e propriedades antiasmáticas. Estudos químicos mostram a presença de alcaloides em sua casca assim como em outras espécies de *Aspidosperma*, entre estes alcaloides, foram descritos a aspidospermina, a aspidosamina, a aspidospermatina e a quebrachina, que exercem efeitos significativos no sistema nervoso (Durañona & Domínguez 1928). Sua madeira é considerada pesada, dura e flexível, atributos que a tornaram uma ótima opção para marceneiros confeccionarem artigos que necessitam de resistência à choque e flexão, como é o

exemplo de carrocerias, alças de ferramentas, calçados, etc. (Ezcurra 1981). Em Santiago del Estero, capital da província de Santiago del Estero no norte argentino, a fabricação de carvão também foi uma das diversas aplicações da madeira desta espécie (Leonardis 1948).

As evidências de uso de *A. quebracho-blanco* indicam os seus riscos diante dos registros crescentes de áreas de loteamentos, expansão de áreas urbanizadas e exploração desenfreada do Chaco seco (Vallejos et al. 2014), situação que sugere ações que visam apoiar a investigação científica da espécie são extremamente necessárias, esperando-se apontar novas direções para o manejo das populações naturais da espécie.

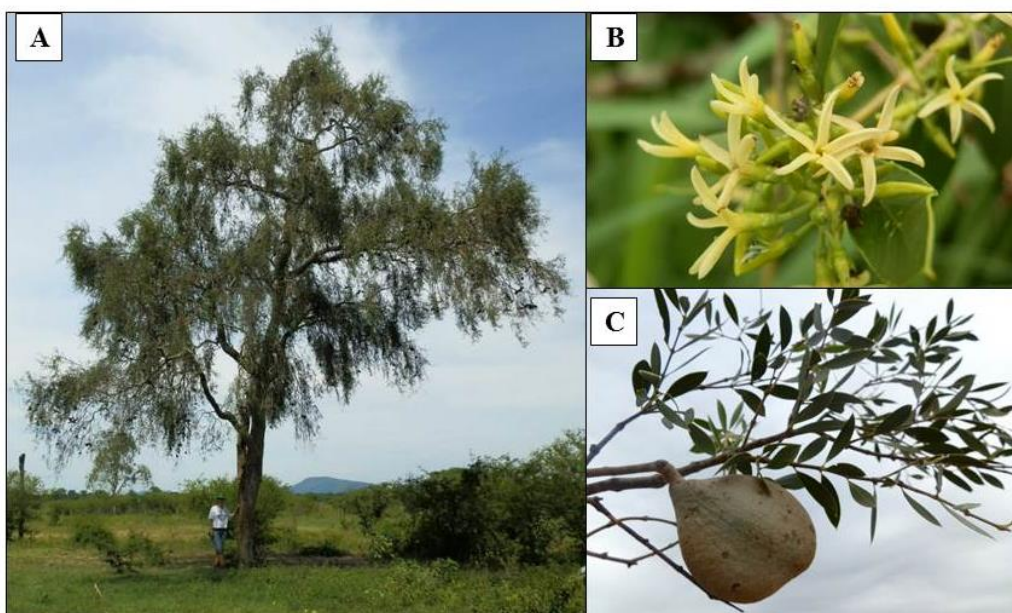


Figura 1. *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlttdl. na formação de Chaco em Porto Murtinho- MS, Brasil. (A) Indivíduo adulto, (B) Detalhe da inflorescência, (C) Detalhe do Fruto. Fotos: Farinaccio, M.A.

1.3 Formações de Chaco

Os aproximadamente 1.000.000 km² das formações de Chaco estão restritos ao continente sul americano, os quais são compartilhadas entre a Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai. No território brasileiro encontra-se a menor parte das formações chaquenhas, aproximadamente 70.000 km², no Mato Grosso do Sul em uma faixa estreita paralelamente ao rio Paraguai (Hueck 1972, Prado 1993, Zak & Cabido 2002). Contrasta-se entre serras e áreas planas, savanas secas e áreas inundáveis, brejos e

salitrais, apresentando em seus ecossistemas grande diversidade espécies, consideráveis níveis de endemismos quando comparados a outras áreas sub úmidas, áridas e semiáridas. (Hueck 1955, Veloso 1972, Chodat & Vischer 1919, Allem & Valls 1987).

O termo “savana estépica”, nomenclatura também utilizada para o chaco brasileiro, apresenta uma série de divergências, necessitando de uma definição e delimitação mais adequada em estudos futuros (Barbosa & Miranda 2005). As discordâncias entre o emprego dos nomes podem ter origem da etimologia do termo “savana”, derivada de uma palavra ameríndia que se refere a uma paisagem “sem árvores, mas com muita erva alta e baixa” (Beard 1953, Cole 1960, Brasil 1975). O termo utilizado pelo Governador da Antigua Espanhola tem várias possibilidades para uso (Eiten 1977, 1982), criando diversas interpretações para o sistema fisionômico-ecológico de Savana Estépica.

Entre as limitações de savana conhecidas está o Parque do Espinilho, classificado como parte de uma disjunção da vegetação chaquenha de formação tipo “Savana Estépica” (Veloso et al. 1991), com indícios de que esta fitofisionomia tenha sido mais extensa no passado antes de estresses naturais e antrópicos (Galvani & De Moura 2003, Marchiori & Alves 2011, Evaldt et al. 2014), podendo indicar que o Parque e o Chaco argentino tenham sido conectados no passado, posto que a Província do Espinal, localizada na Argentina, contorna e perpassa levemente o Rio Grande do Sul, na região de Barra do Quaraí, sugerindo uma continuação desta unidade fitogeográfica (Cabrera & Willink 1973, Marchiori & Alves 2010). Além disso, as Matas Ciliares são consideradas como formadoras de corredores que apropriam o compartilhamento de vários táxons (Waechter 2002), reforçando ainda mais a hipótese pré-disjunção.

Independente da classificação adotada, as formações de Chaco possuem histórico de ocupação agropecuária. Os registros para região mostram supressão da vegetação nativa por áreas contínuas de pastagem plantada, pecuária extensiva e culturas agrícolas. Apesar desses dados agravantes trazidos por pesquisas realizadas nos países com porções de Chaco, algumas comunidades ainda tratam a região com menosprezo, principalmente por seus contrastes de temperatura, clima, dificuldade de acesso e até mesmo pela quantidade de artrópodes e serpentes, ficando claro a necessidade de ações de políticas públicas para valorização e proteção deste ambiente (Torraca 2006, Costa & Moretti 2016).

Estudos de variabilidade genética de plantas para fins de conservação e inventário biológico aos poucos se fazem presentes no Chaco. Em função da

importância e dos riscos que espécies da região podem apresentar, alguns trabalhos já estimaram a estrutura genética de populações de espécies nativas, apresentando diagnósticos de diversidade que podem ser aplicados à conservação das espécies (Alves et al. 2018, Godoy et al. 2018). Também, um estudo já apresentou inferências sobre a relação de eventos geoclimáticos na estrutura genética de plantas sul-americanas, apontando possíveis migrações para a planície do Chaco-Pampa (Moreno et al. 2018).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Subsidiar estratégias de conservação de *Aspidosperma quebracho-blanco* a partir do conhecimento de sua diversidade genética nos habitats naturais.

2.2. Objetivos Específicos

- Testar e otimizar a utilização de marcadores moleculares ISSR em *Aspidosperma quebracho-blanco*;
- Relacionar os dados de distribuição espacial das populações com a diversidade genética.
- Definir populações e áreas prioritárias para a conservação da espécie.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allem AC, Valls JFM. 1987. Recursos forrageiros do Pantanal Mato-Grossense. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília.
- Alves FM, Sartori ÂL, Zucchi MI, Azevedo-Tozzi AM, Tambarussi EV, Alves-Pereira A, De Souza, AP. 2018. Genetic structure of two *Prosopis* species in Chaco areas: a lack of allelic diversity diagnosis and insights into the allelic conservation of the affected species. *Ecology and evolution* 8: 6558-6574.
- APG IV. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1-20.
- Avise JC. 2010. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. *Conservation Genetics* 11: 665-669.
- Barbosa RI, Miranda, IS. 2005. Diversidade de savanas de Roraima. *Ação Ambiental* 8: 19-23.
- Beard JS. 1953. The savanna vegetation of northern tropical América. *Ecological Monographs* 23: 149-215
- BFG (The Brazil Flora Group). 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant knowledge in Brazil. *Rodriguésia* 66: 1085-1113.
- Borém A, Caixeta ET. 2009. Marcadores moleculares. 2ª Ed., UFV, Viçosa.
- Brasil 1975. Projeto RADAMBRASIL. Levantamento de Recursos Naturais. Ministério das Minas e Energia, Rio de Janeiro, p.428.
- Cabrera AL, Willink A. 1973. Biogeografía de América Latina. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Washington.
- Carvalho PER. 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, Brasília-DF.
- Chodat R, Vischer W. 1919. La végétation du Paraguay; IX. *Bulletin de la Societe botanique de Geneve*. Genève, 2: 226-258.
- Cole MM. 1960. Cerrado, caatinga and pantanal: the distribution and origin of the savanna vegetation of Brazil. *Geographical Journal* 126: 168-177.
- Conner JK, Hartl DL. 2004. A primer of ecological genetics. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Corrêa VB, Corrêa LS. 2009. O Dilema da Produção de Tanino na Fronteira Brasil–Paraguai. *Albuquerque: revista de história* 1.

- Costa LA, Moretti EC. 2016. Chaco-PY em movimento. A produção territorial nas fronteiras latino americanas. *Revista Eletrônica AGB-TL* 1:135-165.
- Damasceno JO, Ruas EA, Rodrigues LA, Ruas CF, Bianchini E, Pimenta JA, Ruas PM. 2011. Genetic differentiation in *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae) over a short geographic distance as assessed by AFLP markers. *Genetics and Molecular Research*. 10:1180-1187.
- Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. 2002. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. Ed, Editora Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- Durañona L, Dominguez JÁ. 1928. Apuntes de Botánica Médica. Arsenio Guidi Buffarini, Buenos Aires.
- Eiten G. 1977. Delimitação do conceito de cerrado. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro 21: 125-134.
- Eiten G. 1982. Brazilian "Savannas". *In: Huntley BJ, Walker, BH. Ecology of Tropical Savannas*. Springer, Berlin.
- Endress ME, Bruyns PV. 2000. A revised classification of the Apocynaceae sl. *The Botanical Review* 66: 1-56.
- Endress ME, Sennblad B, Nilsson S, Civeyvrel L, Chase M, Huysmans S, Grafström E, Bremer B. 1996. A phylogenetic analysis of Apocynaceae sens. strict. and some related taxa in Gentianales: a multidisciplinary approach. *Opera Botanica Belgica* 7: 59-102.
- Endress ME, Liede-Schumann S, Meve U. 2014. An updated classification for Apocynaceae. *Phytotaxa* 159: 175-194.
- Epperson BK. 1997. Gene dispersal and spatial genetic structure. *Evolution* 51:672-681.
- Epperson BK, Allard RW. 1989. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of Lodgepole Pine. *Genetics* 121: 269-377.
- Evaldt ACP, Bauermann SG, Souza PA. 2014. Registros polínicos para o Holoceno tardio da região da Campanha (Rio Grande do Sul, Brasil) e seu significado na história dos paleoambientes da Savana Estépica Parque. *Revista Brasileira de Paleontologia* 17: 183-194.
- Ezcurra C. 1981. Revisión de las Apocináceas de la Argentina. *Darwiniana*, 367-474.
- Faleiro F. 2007. Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Embrapa Cerrados, Planaltina-DF.
- Farinaccio MA, Simões AO. 2018. Check-list das Apocynaceae do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Botânica* 73: 131-146

- Ferreira-Ramos R, Monteiro M, Zucchi MI, Pinheiro JB, Martinez CA, Mestriner MA, Alzate-Marin AL. 2011. Microsatellite markers for *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae), an endangered tropical tree species. *American Journal of Botany*. 98: 300-302.
- Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 20 fev. 2018.
- Galvani FR, De Moura BLR. 2003. Flora do Parque Estadual do Espinilho - Barra do Quaraí, RS. *Revista da FZVA* 10: 42-62.
- Gilbert, B. 1966. Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 38: 315-319.
- Godoy FMDR, Lenzi M, Ferreira BHDS, Silva LVD, Zanella CM, Paggi GM. 2018. High genetic diversity and moderate genetic structure in the self-incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 187: 672-688.
- Heywood JS. 1991. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annual Review of Ecology Systematic* 22: 335-355.
- Hueck, K. 1972. As regiões de matas do Chaco e áreas marginais. *In: As florestas da América do Sul: Ecologia, Composição e Importância Econômica*, Editora Polígono, Brasília 240-275.
- Hueck K. 1955. Bosques chaquenos e extração de tanino no Brasil. *Revista Brasileira de Geografia* 17: 343-346.
- IBGE – Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1992. *Manual Técnico da Vegetação Brasileira: Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais*, Rio de Janeiro, p. 92.
- Judd WS, Sanders W, Donoghue MJ. 1994. Angiosperm family pairs: preliminary phylogenetic analyses. *Harvard papers in Botany* 5: 1-51.
- Kageyama PY, Gandara, FB, Souza LD. 1998. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série Técnica IPEF* 12: 65-70.
- Leonardis RFJ. 1948. *Arboles de la Argentina y Aplicación de su Madera*. Editorial Suelo Argentino, Buenos Aires.
- Marchiori JNC, Alves, FS. 2010. O inhanduvá (*Prosopis affinis* Spreng.) no Rio Grande do Sul. 1- Embasamento fitogeográfico e pendências terminológicas. *Balduinia* 24: 1-11.

- Marchiori, JNC, Alves FS. 2011. O inhanduvá (*Prosopis affinis* Spreng.) no Rio Grande do Sul. 8- Aspectos fitogeográficos. *Balduinia* 29:1-8.
- Marcondes-Ferreira W, Kinoshita LS. 1996. Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 19: 203-214.
- Meyer T., 1947. Apocináceas Argentinas I. *Forsteronia* y *Mesechites* Lilloa 13: 45-58.
- Lorenzi H. 1992. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, Editora Plantarum, Nova Odessa.
- Lorenzi H. 1998. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2ª ed, Editora Plantarum, Nova Odessa.
- Morello J, Protomastro J, Sancholuz L, Blanco C. 1985. Estudio macroecológico de los Llanos de La Rioja. Serie del Cincuentenario de la Administración de Parques Nacionales, Buenos Aires.
- Moreno ES, De Freitas LB, Speranza PR, Solís Neffa, VG. 2018. Impact of Pleistocene geoclimatic events on the genetic structure in mid-latitude South American plants: insights from the phylogeography of *Turnera sidoides* complex (Passifloraceae, Turneroideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 188: 377-390.
- Nagaoka T, Ogihara, Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 597-602.
- Prado DE. 1993. What is the Gran Chaco vegetation in South America? I: A review. Contribution to the study of flora and vegetation of the Chaco. V. *Candollea* 48: 145-172.
- Kinoshita, LS. 2005. Apocynaceae. *In*: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Melhem TS, Martins SE, Kirizawa M, Giulietti AM (eds). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo* Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, RiMa Editora, São Paulo, v.4, p. 35-91.
- Koch I, Rapini A, Kinoshita LS, Simões AO, Spina AP. 2012. Apocynaceae. *In*: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Paula J E, Alves JLH. 1997. Madeiras nativas. Gráfica Gutemberg, Brasília-DF.
- Pereira MDM, Jácome RLRP, Alcântara ADC, Alves RB, Raslan DS. 2007. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Quim Nova* 30: 970-983.
- Potgieter K, Albert VA. 2001. Phylogenetic relationships within Apocynaceae sens. lat. based on *trn-L* intron and *trnL-F* spacer sequences and propagule characters. *In*

- Annals of the Missouri Botanical Garden, Missouri Botanical Garden Press, Missouri, p. 523-549.
- Rapini, A. 2012. Taxonomy “under construction”: advances in the systematics of Apocynaceae, with emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. *Rodriguésia* 63(1): 75-88.
- Rizzini CT, Mors WB. 1995. Botânica Econômica Brasileira. Âmbito Cultural, Rio de Janeiro, p 112-113.
- Rocha CH. 2006. Seleção de áreas prioritárias para a conservação em paisagens fragmentadas: estudo de caso nos Campos Gerais, do Paraná. *Natureza e Conservação* 4: 77-99.
- Santos TRR. 2016. Atributos funcionais e genética de populações de quatro espécies lenhosas em áreas de Cerrado Rupestre e Cerrado Típico. Tese de Doutorado em Botânica, Universidade de Brasília, Brasília-DF.
- Sato AS, De Lima IL, Toniato MTZ, Zimback L. 2008. Crescimento e sobrevivência de duas procedências de *Aspidosperma polyneuron* em plantios experimentais em Bauru, SP. *Revista do Instituto Florestal* 20: 23-32.
- Sennblad B, Bremer B. 1996. The familial and subfamilial relationships of Apocynaceae and Asclepiadaceae evaluated with *rbcL* data. *Plant Systematics and Evolution*. 202: 153-175
- Sennblad B, Bremer B. 2002. Classification of Apocynaceae sens. lat. According to a new approach combining Linnean and Phylogenetic Taxonomy. *Systematic Biology* 51: 389-409.
- Simões AO, Livshultz T, Conti E, Endress ME. 2007. Phylogeny and Systematic of the Rauvolfioideae (Apocynaceae) Based on Molecular and Morphological Evidence. *Annals of the Missouri Botany Garden* 94: 268–297.
- Slatkin M, Arter HE. 1991. Spatial autocorrelation methods in population genetics. *American Naturalist* 138:499-517.
- Sokal RR, Oden NL. 1978. Spatial autocorrelation in biology: 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. *Biological Journal of Linnean Society* 10: 229-249.
- Telles MPDC, Diniz Filho JAF, Coelho ASG, Chaves LJ. 2001. Autocorrelação espacial das frequências alélicas em subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC., Myrtaceae) no sudeste de Goiás. *Revista Brasileira de Botânica*, 24: 145-154.

- Torezan JMD, Souza RF, Ruas PM, Ruas CF, Camargo EH, Vanzela ALL. 2005. Genetic Variability of Pre and Post-Fragmentation Cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology 48: 171-180.
- Torraca, MME. 2006. Imigração e Colonização Menonita no processo de legitimação do Chaco Paraguaio (1921-1935). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.
- Vallejos M, Volante JN, Mosciaro MJ, Vale L, Bustamante ML, Paruelo JM. 2014. Dynamics of the natural cover transformation in the Dry Chaco ecoregion: A plot level geo-database from 1976 to 2012. Journal of Arid Environments 123: 1-9.
- Vega-Ávila E, Velasco-Lezama R, Jiménez-Estrada M. 2006. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. Bioquímica 31: 97-111.
- Veloso HP. 1972. Aspectos fitoecológicos da Bacia do Alto Rio Paraguai. USP, São Paulo.
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima JCA. 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um Sistema Universal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 124p
- Waechter JL. 2002. Padrões geográficos na flora atual do Rio Grande do Sul. Ciência e Ambiente 24: 1-16.
- Woodson-Jr RE. 1951. Studies in the Apocynaceae VIII. An interim Revision of the Genus *Aspidosperma* Mart & Zucc. Annals of the Missouri Botany Garden 38: 118-207.
- Zak MR, Cabido M. 2002. Spatial patterns of the Chaco vegetation of central Argentina: Integration of remote sensing and phytosociology. Applied Vegetation Science 5: 213-226.
- Zimback L, Mori ES, Kageyama PY, Hideyo A. 2011. Estrutura genética de peroba (*Aspidosperma polyneuron*) no Estado de São Paulo, Brasil. Revista do Instituto Florestal 23: 265-277.

4. Normas da Forests — Open Access Journal para submissão de artigos científicos

These sections should appear in all manuscript types

- **Title:** The title of your manuscript should be concise, specific and relevant. It should identify if the study reports (human or animal) trial data, or is a systematic review, meta-analysis or replication study. When gene or protein names are included, the abbreviated name rather than full name should be used.
- **Author List and Affiliations:** Authors' full first and last names must be provided. The initials of any middle names can be added. The PubMed/MEDLINE standard format is used for affiliations: complete address information including city, zip code, state/province, country, and all email addresses. At least one author should be designated as corresponding author, and his or her email address and other details should be included at the end of the affiliation section.
- **Abstract:** This is the abstract section, about 300 words maximum. For research articles, abstracts should give a pertinent overview of the work. We strongly encourage authors to use the subheadings given. *Research Highlights:* Place the novelty of the content and highlight the significance of the study. *Background and Objectives:* Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study. *Materials and Methods:* Describe briefly the main methods or treatments applied, including the study population description. *Results:* Summarize the article's main findings. *Conclusions:* Indicate the main conclusions or interpretations.
- **Keywords:** Three to ten pertinent keywords need to be added after the abstract. We recommend that the keywords are specific to the article, yet reasonably common within the subject discipline.

Research Manuscript Sections

- **Introduction:** The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance, including specific hypotheses being tested. The current state of the research field should be reviewed carefully and key publications cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the work and highlight the main conclusions. Keep the introduction comprehensible to scientists working outside the topic of the paper.

- **Results:** Provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation as well as the experimental conclusions that can be drawn.
- **Discussion:** Authors should discuss the results and how they can be interpreted in perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible and limitations of the work highlighted. Future research directions may also be mentioned. This section may be combined with Results.
- **Materials and Methods:** They should be described with sufficient detail to allow others to replicate and build on published results. New methods and protocols should be described in detail while well-established methods can be briefly described and appropriately cited. Give the name and version of any software used and make clear whether computer code used is available. Include any pre-registration codes.
- **Conclusions:** This section is mandatory, and should provide readers with a brief summary of the main conclusions.
- **Supplementary Materials:** Describe any supplementary material published online alongside the manuscript (figure, tables, video, spreadsheets, etc.). Please indicate the name and title of each element as follows Figure S1: title, Table S1: title, etc.
- **Acknowledgments:** All sources of funding of the study should be disclosed. Clearly indicate grants that you have received in support of your research work and if you received funds to cover publication costs. Note that some funders will not refund article processing charges (APC) if the funder and grant number are not clearly and correctly identified in the paper. Funding information can be entered separately into the submission system by the authors during submission of their manuscript. Such funding information, if available, will be deposited to FundRef if the manuscript is finally published.
- **References:** References must be numbered in order of appearance in the text (including table captions and figure legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as EndNote, ReferenceManager or Zotero to avoid typing mistakes and duplicated references. We encourage citations to data, computer code and other citable research material. If available online, you may use reference style 9. below.

Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the main text and in the reference list. In the text, reference numbers

should be placed in square brackets [], and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10). or [6] (pp. 101–105).

References should be described as follows, depending on the type of work:

Journal Articles: Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name* **Year**, *Volume*, page range. Available online: URL (accessed on Day Month Year).

Books and Book Chapters: Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; pp. 154–196. 3. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; Volume 3, pp. 154–196.

Unpublished work, submitted work, personal communication: Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. status (unpublished; manuscript in preparation). 5. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Abbreviated Journal Name* stage of publication (under review; accepted; in press). 6. Author 1, A.B. (University, City, State, Country); Author 2, C. (Institute, City, State, Country). Personal communication, Year.

Conference Proceedings: Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Title of the Collected Work* (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds. (if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).

Thesis: Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.

Websites: Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year). Unlike published works, websites may change over time or disappear, so we encourage you create an archive of the cited website using a service such as [WebCite](#). Archived websites should be cited using the link provided as follows: Title of Site. URL (archived on Day Month Year).

4.1 ARTIGO

Diversidade genética e fragmentação de habitats naturais de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltl. (APOCYNACEAE), questões para conservação em vegetações chaquenas e de Savana Estépica

Thomáz Botelho ^{1,2,3*}, Gecele Paggi ^{1,2} e Maria Ana Farinaccio ^{1,3},

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Biociências, Campo Grande-MS, Brasil;

² Laboratório de Genética, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus do Pantanal, Corumbá-MS, Brasil

³ Laboratório de Botânica, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus do Pantanal, Corumbá-MS, Brasil

* Correspondência: guerreirobotelho@gmail.com.

Resumo

Destaques da pesquisa: A exploração de *Aspidosperma quebracho-blanco* trouxe mudanças econômicas como a instalação de indústrias em áreas de exploração nos países de ocorrência da espécie. As fragmentações de vegetações chaquenhas, decorrentes principalmente de desmatamento, mostram uma grande necessidade na compreensão de padrões de estruturação e distribuição da diversidade genética em populações da espécie, sendo importantes indicadores na tomada de estratégias de conservação e uso de recursos genéticos. *Antecedentes e Objetivos:* As alterações do passado agravados pela perda de cobertura arbórea tem colocado os índices de desflorestamento do Chaco como um dos maiores do mundo, podendo causar redução do fluxo gênico nas populações naturais deste ambiente. Nesse sentido, o presente estudo compara dados da diversidade genética aos de fragmentação de habitats naturais de *A. quebracho-blanco*, subsidiando estratégias de conservação como a definição de áreas prioritárias. *Materiais e Métodos:* Foram extraídos DNA genômicos de 25 indivíduos de *A. quebracho-blanco* provenientes de cinco populações da Argentina, Brasil e Paraguai, dos quais foram amplificados utilizando seis marcadores ISSR. Os genótipos foram agrupados em matriz de distância e dendrograma, sendo avaliados de acordo com índices de diversidade genética de Nei (He), Shannon (H'), Conteúdo de informação polimórfica (PIC) e Heterozigose (H), estabelecendo relações entre os dados de georreferenciamento das áreas de amostradas. *Resultados:* As populações apresentam baixa diversidade genética, variando entre 0,09 e 0,15 para o índice de Shannon, e de 0,19 a 0,31 na diversidade de Nei, valores proporcionalmente relacionados aos níveis de fragmentação observados. *Conclusões:* A necessidade de unidades de conservação onde espécie se encontra é indispensável para à conservação de seus recursos genéticos. Em contrapartida, são necessários bancos de germoplasmas da população de Córdoba (Argentina), região com diversidade genética maior e menor fragmentação, garantindo a conservação e multiplicação de material vegetal de *Aspidosperma quebracho-blanco*.

Palavras-chave: Chaco; diversidade genética; fragmentação; ISSR

Introdução

A exploração de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl., espécie característica de ambiente de Chaco na Argentina, Brasil e Paraguai [1,2], requer uma atenção especial no que diz respeito à conservação da espécie, sendo esta alvo de exploração em larga escala. Tal exploração se deve ao fato da presença de tanino em sua madeira, substância utilizada na fabricação de produtos químicos e curtimento de couros, que motivou a instalação de indústrias nas regiões no entorno do Chaco, ameaçando as populações naturais da espécie. [3,4].

Atualmente, as vegetações de Chaco passam por um processo generalizado e crescente de desertificação, resultado da exploração dos recursos naturais, especialmente por desmatamento [5]. As alterações do passado agravados pela perda de cobertura arbórea desde 2000 e a expansão agrícola, tem colocado os índices de desflorestamento do Chaco como um dos maiores do mundo [6-8], situação que impõe desafios aos remanescentes desta fitofisionomia, visto que a fragmentação altera a diversidade genética das populações [9].

A transformação das paisagens e a alteração da dinâmica evolutiva de populações naturais devido à fragmentação foram estudadas recentemente nos trópicos, porém de forma restrita a florestas úmidas. Dessa maneira, florestas secas, como boa parte das vegetações do Chaco e Savana Estépica, continuam apontadas como carentes em estudos desse tipo [10], os quais são indispensáveis para a compreensão dos efeitos da fragmentação e a conservação de espécies na região.

Os efeitos da fragmentação dos habitats são apontados como causadores de endogamia e redução do fluxo gênico em populações naturais, acelerando a redução e extinção destas populações pelo isolamento reprodutivo [11]. Além disso, as populações

correm o risco de apresentar comprometimento no processo de colonização de outras áreas, em função da diminuição da variabilidade genética por endocruzamento [12,13]. Essas características são determinantes para o desenvolvimento e sobrevivência dos indivíduos após uma possível regeneração, determinando inclusive a estrutura populacional da espécie [14].

Ao serem expostas a perturbações, populações naturais em florestas tendem a se reestruturar enquanto são modificadas, restabelecendo processos de reprodução como polinização, dispersão de sementes e recrutamento de propágulos [15] e de variabilidade genética necessária para a manutenção de populações, como a migração e fluxo gênico [16]. Porém, mesmo que sua identidade e função populacional seja mantida [17], não é garantida a recuperação da estrutura genética original, visto que a diversidade genética pode variar se as populações forem persistentes ou colonizantes.

As perturbações e distribuição restrita das espécies são apresentadas como características que podem contribuir para a evolução de sistemas de autocompatibilidade, que inicialmente podem acarretar em baixa variabilidade genética e, conseqüentemente, a amplitude de nicho, fator de grande influência na ocupação de novas áreas [18]. Tais condições podem estar ocorrendo nas populações de *A. quebracho-blanco* devido à fragmentação de seus habitats naturais, mostrando a necessidade de serem avaliadas.

Avaliações de diversidade genética de espécies ameaçadas pela fragmentação de habitat têm apresentado bons resultados em estratégias de conservação e manutenção de populações naturais [19,20], oferecendo dados para compreensão de padrões de estruturação e distribuição da variabilidade genética, os quais são indicadores importantes para compreender questionamentos acerca de populações naturais, principalmente sobre os processos evolutivos. Estudos utilizando dados genéticos

também podem sugerir áreas para plantios que visem capturar a diversidade, porção significativa da diversidade genética e necessidades de unidades de conservação [21].

Os crescentes avanços nos estudos de biologia molecular têm utilizado marcadores moleculares em espécies ameaçadas, sendo facilitadores nas estratégias de conservação e uso de recursos genéticos de forma mais adequada [22,23]. Assim, estratégias de conservação que empregam o uso destes moleculares podem quantificar a potencialidade dos recursos genéticos disponíveis nas populações, permitindo elucidar e pressupor futuros eventos genéticos, assim como pontos de conexão entre as populações e seus eventos evolutivos, atribuindo aos marcadores moleculares uma posição de excelência, visto que outros tipos de marcadores são neutros frente às modificações ambientais [24,25].

Entre tipos de marcadores moleculares utilizados nas análises de genética de populações, os ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) vêm ganhando espaço devido à sua eficácia na detecção de polimorfismos, abundância no genoma, reprodutibilidade entre laboratórios, menor custo, e por ser uma técnica relativamente simples [26,27]. Estes marcadores também usam um único primer para se obter fragmentos, e acessar o “fingerprinting” do germoplasma de espécies cultivadas e nativas, auxiliando também na elucidação de relações evolutivas entre espécies [28,29].

As particularidades de cada população obtidas a partir de marcadores moleculares podem ser quantitativamente relacionadas às características geográficas [30]. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivo relacionar os dados de distribuição espacial das populações com a diversidade genética obtidas, definindo populações prioritárias para conservação.

1. Material e Métodos

2.1 Área de estudo e amostragem

Para o desenvolvimento deste estudo foram realizadas expedições de coleta em toda área de distribuição conhecida de *Aspidosperma quebracho-blanco* (Argentina, Brasil e Paraguai), sendo os materiais testemunhos (Tabela 1) depositados nos Herbários da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CGMS e COR), Museu Botânico Córdoba (CORD) e Universidad Nacional de Asunción (FACEN).

As folhas coletadas foram armazenadas em frascos hermeticamente fechados contendo sílica gel, para rápida desidratação [31]. Os 25 indivíduos coletados são provenientes de cinco populações: BAQ (Barra do Quaraí, Brasil); COB (Córdoba, Argentina); FIL (Filadélfia, Paraguai); FOR (Formosa, Argentina); e PMU (Porto Murtinho, Brasil).

As populações COB, FIL, FOR e PMU localizam-se em área de Chaco, ambiente que passou por perturbações no passado por meio da exploração madeireira e desmatamento para a implantação de pastagens [7]. Nela há um maior número de populações de *A. quebracho-blanco*, diferentemente da região de Barra do Quaraí (Brasil), onde BAQ é a única representante. A fitofisionomia presente no município é predominantemente de Savana Estépica, apresentando muitos campos com espininhos. Espininho é o nome popular dado a *Acacia caven* (Mol.) Mol., uma das espécies arbóreas mais representativas na região [2].

2.2 Extrações de DNA e seleção de loci

O DNA genômico foi extraído a partir de folhas segundo protocolo de extração [32] com modificações de quantidade de isopropanol (750 µL) após a coleta da fase aquosa.

O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 1%, corado com SyberGold™ (Invitrogen®) em comparação com DNA de fago λ .

Foram testados 33 *loci* de ISSR, sendo 30 deles desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade Britânica de Columbia (UBCBL) [33] e outros três por Al-Otaibi [34]. As amplificações foram realizadas por PCR em reações de 25 μ L, contendo: \approx 30 ng de DNA, 1X de tampão da enzima, 2,0mM de MgCl₂, 0,15mM de dNTP mix, 0,5 pmol de “primer ISSR” e 1 U de Taq DNA polimerase (Go Taq, Promega©), amplificadas em termociclador Veriti 96-poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando as condições previamente descritas [35,36]. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com SyberGold™ (Invitrogen©) e TBE 1X, sob corrente elétrica contínua de 120 mA. O marcador de peso molecular utilizado foi o ladder 1Kb (Invitrogen©), sendo os produtos fotografados com a incidência de luz azul.

2.3 Análise de dados genéticos

Para caracterizar a diversidade genética das populações de *A. quebracho-blanco* foram selecionados os *loci* de ISSR polimórficos com maior número de fragmentos, boa resolução e caráter mais informativo. Os *loci* polimórficos obtidos foram observados e fotografados em géis de agarose para uma análise categórica no software Image J® [37], onde os dados coletados foram utilizados na construção de uma matriz binária baseada na presença (1) e ausência (0) de bandas para todos os *loci* selecionados, utilizada para calcular a matriz de similaridade, considerando como complemento aritmético o índice de Jaccard [38], com o qual foram obtidas as semelhanças genéticas dentro e entre as populações.

Para estabelecer um agrupamento de genótipos baseado na similaridade genética e construir um dendrograma utilizou-se o método UPGMA (“unweighted pair group method with arithmetic mean”) [39]. A matriz de distância e o dendrograma foram obtidos com o auxílio do programa Past 3.0® [40]. Para analisar a diversidade dentro e entre as populações estudadas foi utilizado o programa Genes® [41], estimando-se os seguintes parâmetros de diversidade: a diversidade genética de Nei (H_e) [42], o índice de Shannon (H') [43], o conteúdo de informação polimórfica (PIC), que varia de 0 a 0,5 em marcadores dominantes[44] e a heterozigose a partir de dados binários[41].

2.4 Identificação de habitats fragmentados por georreferenciamento das áreas de coleta

As populações coletadas foram representadas cartograficamente utilizando-se o software QGIS® 3.0[45], com as limitações de vegetação de Chaco e Campos com Espinilho previamente delimitadas em estudos anteriores [47-48]. O software QGIS® 3.0 também foi utilizado para identificar degradação de paisagens que pudessem representar possíveis riscos às populações amostradas. A representação dos objetos cartográficos e locais das coletas foi feita com arquivos *shapefile* do tipo linha para representar as áreas de desmatamento no Chaco [49] e antropizações nas proximidades dos Campos com Espinilho [50]

2. Resultados

3.1 Sucesso das amplificações e polimorfismos

Os produtos amplificados apresentaram perfis eletroforéticos satisfatórios (Figura 1), totalizando 450 bandas nas regiões de 200 a 5000pb. Dos 33 *loci* testados em A.

quebracho-blanco, 16 amplificaram (48%) (Tabela 2), sendo seis *loci* selecionados aqueles que apresentaram melhores padrões de bandas e polimorfismos nas condições testadas, amplificando 124 produtos (dois a seis produtos por população), dos quais foram identificados 37 polimorfismos (45,8%), com uma média de seis polimorfismos por marcador.

Entre os *loci* selecionados para análises de diversidade e similaridade foram observados uma média de 20 produtos por primer: 22 produtos (18,3%) em UBC 888; 21 (17,5%) em UBC 808 e UBC 856; 19 produtos (15,8%) em Primer No.7 e UBC 842 e; 18 produtos (15%) em UBC 857. O tamanho amostral das populações de *A. quebracho-blanco* foi inferior a 50, sendo assim foram considerados como polimórficos os *loci* com frequência do alelo mais comum em valores menores ou iguais a 95% [51].

3.2 Similaridades das populações

Os valores de coeficiente da matriz de similaridade entre as populações variaram entre 0,26 e 0,55, média de 0,41 (Tabela 3), onde a maior similaridade foi entre a população de FIL e de FOR. O dendrograma construído com base no UPGMA entre os genótipos populacionais analisados separou PMU das demais populações, e formou mais dois grupos com valores de similaridade superiores a 0,51. No ramo I foram agrupadas FOR e FIL, e no ramo II COB e BAQ (Figura 2).

Entre os indivíduos amostrados em diferentes populações os valores da matriz de similaridade encontrados variaram entre 0,0 e 0,77, sendo os valores entre indivíduos da mesma população entre 0,0 e 0,92 (Tabela 4). Também, pelos mesmos critérios utilizados para análise populacional, o dendrograma dos 25 indivíduos analisados agrupou representantes de populações diferentes em ramos próximos, sendo PMU a

população que apresentou valores mais distintos de similaridade entre os seus indivíduos (Figura 3).

3.3 Diversidade genética

As médias de diversidade genética observadas nas populações foram baixas e variaram entre 0,09 e 0,15 para o índice de Shannon, e de 0,19 a 0,31 na diversidade de Nei (Figura 4). A frequência de alelos e heterozigose (Tabela 5) apresentaram valores relativamente próximos nas populações FOR, FIL, COB e BAQ, coincidindo com os padrões de conteúdo de informação polimórfica (PIC) obtido com os acessos dos seis marcadores testados (Tabela 6).

3.4 Distribuição das populações e impactos ambientais

A distribuição das populações está concentrada, ou seja, mais próximas umas das outras, nas limitações de Chaco Seco (ao norte das fitofisionomias amostradas), contornando as formações de Chaco úmido até chegar na disjunção da vegetação chaquenha classificada como “Campos com Espinilho na Savana Estépica” (Figura 5).

Impactos ambientais em maior intensidade foram observados na região norte do Chaco e na Savana Estépica, locais onde estão localizadas as populações de PMU, FIL, FOR e BAQ (Figura 5). Foram identificadas também pelas análises de georreferenciamento, em uma escala menor, que a população PMU está na região de borda do Chaco, e regiões desmatadas muito próximas de FIL, além de áreas antropizadas no entorno do Parque Estadual do Espinilho (Brasil) em BAQ e unidades de conservação nas limitações do Parque Provincial Chancaní, (Argentina) em COB.

3. Discussão

4.1 Amplificações de loci de ISSR e polimorfismos

Assim como o presente estudo, outros trabalhos que utilizaram marcadores moleculares em espécies do gênero *Aspidosperma* Mart. [52-54], mostraram a ocorrência de valores inferiores a 40% tanto na quantidade de produtos amplificados, considerando os primers testados, quanto nos polimorfismos encontrados por primer. Além dessa problemática, que envolve gastos e prolongamento na obtenção de resultados, a extração de DNA das folhas de *Aspidosperma* pode ser comprometida devido à presença de uma grande variedade de alcaloides [55-57] e polissacarídeos [58], responsáveis por possíveis inibições da Taq DNA polimerase na reação de amplificação por PCR [69,60]. Além da possibilidade de ocorrências dessas substâncias na extração, *A. quebracho-blanco* é uma espécie fonte de taninos [61], compostos que precipitam junto com o DNA na extração, degradando assim sua qualidade e reduzindo o rendimento [62,63]. Considerando as possíveis implicações dos procedimentos de extração e amplificação, podemos considerar que os produtos obtidos estão dentro do esperado e puderam responder aos questionamentos propostos.

4.2 Diversidade Genética

A estrutura genética espacial observada em populações naturais é decorrente dos padrões específicos de distribuição espacial dos alelos e genótipos dos indivíduos dentro das populações [64]. As análises genéticas mostraram que a distribuição dos genótipos de *A. quebracho-blanco* não ocorreu de forma aleatória, uma vez que verificamos a presença de indivíduos de sítios próximos em ramos iguais, sugerindo isolamento por distância [65]. Além disso, a dispersão de sementes e recrutamento de plântulas é favorecido nas populações PMU, FIL e FOR, uma vez que o ambiente de Chaco árido e

semiárido é marcado pela escassez de chuva [66], fator que favorece a anemocoria [67] da espécie, aumentando a similaridade genética entre estes fragmentos, devido ao fluxo gênico via sementes [68].

A geitogamia é eficaz em *A. quebracho-blanco*, indicando que a espécie é autocompatível [69], característica já registrada em espécies de Apocynaceae [70-72]. A probabilidade de chegada de pólen estrangeiro só é maior devido a existência de protandria e posição das flores (pendentes e algumas vezes na posição horizontal), características que impedem a autofertilização [69]. Também, a mudança de sistema reprodutivo para autocompatibilidade é apontada como responsável pela redução da heterozigose [73,74] e possivelmente da diversidade genética em populações naturais [75-76], justificando em parte os valores obtidos para a frequência de alelos recessivos, baixa heterozigose e informação polimórfica (PIC) neste estudo.

O estabelecimento de populações autogâmicas está relacionado com as reduções de habitats naturais, que dificultam a polinização cruzada e garantem sobrevivência significativa de mutantes autocompatíveis [77]. Efeitos similares já foram observados no chaco serrano em sistemas reprodutivos de plantas [78], como é o exemplo de *A. quebracho-blanco*, cujo sistema reprodutivo é marcado pela limitada polinização noturna de traças e de maneira enganosa por mariposas [69].

As porções norte e noroeste do Chaco são marcadas por repentinas mudanças da cobertura do solo [79], locais onde são observados os menores valores na diversidade das populações. Vale ressaltar que as áreas ao entorno de BAQ, passaram por períodos já registrados com variações dos seus solos hidromórficos com processo de degradação dos horizontes superficiais e regeneração natural de porções com sinais de degradação antrópica como um todo na região [80,81]. Sendo assim, as populações amostradas

estão localizadas próximas a impactos antrópicos que ameaçam sua diversidade genética atual.

Assim como os resultados aqui apresentados, a perda de habitat pela antropização também ameaça a diversidade genética espécies arbóreas de Apocynaceae. Em um estudo com *Hancornia speciosa* Gomes em habitats fragmentados, o índice de Shannon (H') obtido foi de 0,26, e 0,18 no índice de Nei (H_e) [82], valores indicadores a serem considerados no estabelecimento de novas unidades de conservação, posto que o histórico de perturbações nos fragmentos possa tornar as populações mais vulneráveis aos efeitos de deriva genética, com possível endogamia e efeito de borda, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e cruzamento entre indivíduos aparentados e próximos [83,84].

4.3 Conservação da espécie

As condições ambientais em locais áridos são fatores críticos para o estabelecimento de mudas [85,86]. Para a regeneração e estruturação dessas regiões, plântulas podem recrutadas de unidades conservação, como já foi observado em plântulas proveniente do Parque Provincial Chancaní (Argentina) [87], local onde está localizada a população de maior diversidade genética observada (COB). Estes dados mostram a importância de se comparar as informações genéticas com outros dados, sendo possível inferir questões que envolvem manejo, recuperação de áreas degradadas e parâmetros de distância para coleta de germoplasma, a fim de obter maiores índices de variabilidade genética nas populações amostradas [88].

Ações de conservação são primariamente necessárias para a população de Porto Murtinho, uma vez que a região é a que passou por mais fragmentações entre as formações chaquenas conhecidas nas últimas décadas [89,90]. Além disso, a

variabilidade genética desta população é similar às demais, apresentando genótipos semelhantes as demais populações amostras. Também é possível observar que ao longo da distribuição geográfica, as demais populações do Chaco apresentam maiores valores de diversidade genética, em um gradiente de diversidade Norte - Sul, ou seja, o ponto inicial a ser considerado para diversificação genética é novamente PMU. Portanto, a região de Porto Murtinho apresenta condições prioritárias para criação de áreas de conservação, assegurando o fluxo gênico e diversidade genética entre os demais fragmentos [91].

Além das estimativas de parâmetros genéticos apontarem a necessidade de criação de unidades de conservação nas regiões onde *Aspidosperma quebracho-blanco* foram amostradas, aspectos ecológicos como o registro de mais de 200 tipos de insetos associados a disponibilidade de exsudado extrafloral na espécie [69], também sugerem uma atenção especial para suas relações ecológicas, uma vez que a degradação dos habitats decorrente da urbanização pode ter um papel alterando a diversidade dos artrópodes [92].

Diante das constatações aqui apresentadas, vale ressaltar que a situação genética e posição geográfica de *Aspidosperma quebracho-blanco* alerta para um provável comprometimento à diversidade genética dos indivíduos, questão a ser considerada para inclusão da espécie em listas de espécies ameaçadas, sendo estas ferramentas importantes para conservação, principalmente no planejamento de ações e programas de conservação [93]

5. Conclusões

Os resultados aqui obtidos apontam a importância das unidades de conservação na diversidade genética de populações naturais, representando uma solução para a

conservação dos recursos genéticos de *Aspidosperma quebracho-blanco*, já que os prejuízos causados pela antropização do chaco e campos com espininhos são refletidos na perda de habitat e diversidade genética nas populações estudadas. Em contrapartida, são necessárias mudanças no *status* de conservação da espécie e criação bancos de germoplasmas de populações provenientes de regiões com menos efeitos de fragmentação, garantindo a conservação e multiplicação de material vegetal como mecanismo de segurança para espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Laboratório de Genética da UFMS/CPAN e Laboratório de Estudos Sócioambientais UFMS/CPAN pelo apoio técnico.

Ao CNPq e Fundect, pelo auxílio financeiro concedido através do TERMO DE OUTORGA: 202/2014, SIAFEM: 023909, Processo: 23/200.614/2014—.

Referências

1. Marcondes-Ferreira, W.; Kinoshita, L.S. Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). *Rev. Bras. Bot.* **1996**, 19, 203–214.
2. Galvani, F.R.; De Moura, L.R.B. Flora do parque estadual do espinilho–Barra do Quaraí/RS. *Rev. FZVA* **2003**, 10, 42–62.
3. Hueck, K. Bosques chaquenhos e extração de tanino no Brasil. *Rev. Bras. Geogr.* **1955**, 17, 343–346.
4. Bandeira, L.A.M. A Guerra do Chaco. *Rev. Bras. Polít. Int.* **1998**, 41, 162–197.
5. Pasig, R. Origen y Dinámica del Agua Subterránea en el noroeste del Chaco Sudamericano. Tese de Doutorado, Universität Würzburg, Alemanha, **2005**.
6. Hansen, M.C.; Potapov, P.V.; Moore, R.; Hancher, M.; Turubanova, S.A.; Tyukavina, A; Townshend, J.R.G. High-resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science* **2013**, 342, 850–853.
7. Vallejos, M.; Volante, J.N.; Mosciaro, M.J.; Vale, L.M.; Bustamante, M.L.; Paruelo, J.M. Transformation dynamics of the natural cover in the Dry Chaco ecoregion: a plot level geo-database from 1976 to 2012. *J. Arid Environ.* **2015**, 123, 3–11.
8. Baumann, M.; Israel, C.; Piquer-Rodríguez, M.; Gavier-Pizarro, G.; Volante, J.N.; Kuemmerle, T. Deforestation and cattle expansion in the Paraguayan Chaco 1987–2012. *Reg Environ Change.* **2017**, 17, 1179–1191.
9. Hamrick, J.L. Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecol. Manag.* **2004**, 197, 323–335.
10. Basualdo, M.; Huykman, N.; Volante, J.N.; Paruelo, J.M.; Piñeiro, G. Lost forever? Ecosystem functional changes occurring after agricultural abandonment

- and forest recovery in the semiarid Chaco forests. *Sci. Total Environ.* **2019**, 650, 1537–1546.
11. Frankham, R. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* **2005**, 2, 131-140.
 12. Young, A.; Boyle, T.J. Forest fragmentation. In: *Forest conservation genetics: principles and practice*, Young A., Boshier D., Boyle T., Eds.; CABI Publishing: Wallingford, Reino Unido, 2000, pp. 123–134.
 13. Schneider, M.P.C.; Batista, C.G.; Carvalho, D.; Cerqueira, R.; Ciampi, A.Y.; Franceschinelli, E.V.; Gentile, R.; Gonçalves, E.C.; Grativol, A.D.; Nascimento, M.T.; Pova, J.R.; Vasconcelos, G.M.P.; Wadt, L.H.O.; Wiederhecker, H.C. Genética de Populações Naturais. In: *Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas*, Rambaldi D.M., Oliveira D.A.S., Eds.; Ministério do meio ambiente: Brasília, Brasil, 2003, pp. 297–315.
 14. Medeiros, M.M.; Felfini, J.M.; Andréia, M.L. Comparação florístico-estrutural dos estratos de regeneração e adulto em Cerrado *sensu stricto* no Brasil Central. *Rev. Cerne* **2007**, 13, 291–298.
 15. Cullen Júnior, L.; Borges, H.; Lima, J.; Campos, N.; Beltrame, T., Moscolgiato, A.; Ronconi, E. Restauração de paisagens: e desenvolvimento socioambiental em assentamentos rurais do Pontal do Paranapanema. *Rev. Agriculturas* **2006**, 3(3).
 16. Futuyma, D.J. *Biologia evolutiva*, 2ª. ed.; SBG, Ribeirão Preto, Brasil, 1992.
 17. Walker, B.; Holling, C.S.; Carpenter, S.R.; Kinzing, A. Resilience, adaptability and transformability in social–ecological systems. *Ecol. Soc.* **2004**, 9.
 18. Lowry E.; Lester E. The biogeography of plant reproduction: potential determinants of species' range size. *J. Biogeogr.* **2006**, 33, 1975-1982.

19. Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*, EMBRAPA-CENARGEN: Brasília, Brasil, 1998.
20. Finger, A.; Radespiel, U.; Habel, J.C.; Kettle, C.J. Forest fragmentation genetics: what can genetics tell us about forest fragmentation? In *Global Forest Fragmentation*, Department of Environmental System Science: Zurich, Suíça, 2014, pp50–68.
21. Montagna, T.; Ferreira, D. K.; Steiner, F.; Silva, F. A. L. S.; Bittencourt, R. Silva, J. Z.; Mantovani, A.; Reis, M. S. A importância das unidades de conservação na manutenção da diversidade genética de araucária (*Araucaria angustifolia*) no Estado de Santa Catarina. *Biodiversidade Brasileira*. **2012**, 2, 18-25, 2012
22. Frankham, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biol. Conserv.* **2010**, 143, 1919–1927.
23. Avise, J.C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. *Conserv. Genet.* **2010**, 11,665–669.
24. Cruz, C.D.; Ferreira, F.M.; Pessoni, L.A. *Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética*, 1ª.ed.; Suprema Gráfica Editora, Minas Gerais, Brasil, 2011.
25. Rajwant, K.K.; Manoj, K.R.; Sanjay, K.; Rohtas, S.; Dhawan K.A. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* **2011**, 177, 309–334.
26. Gupta, V.S.; Ramakrishna, W.; Rawat, S.R.; Ranjekar, P.K. (CAC)5 detects DNA fingerprints and sequences homologous to gene transcripts in rice. *Biochem. Genet.* **1994**, 32,1–8.

27. Santana, I.B.B.; Oliveira, E.D.; Soares Filho, W.S.; Ritzinger, R.; Amorim, E.P.; Costa, M. A.P.C.; Moreira, R.F.C. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. *Rev. Bras. Frut.* **2011**, *33*, 868–876.
28. Joshi, S.P.; Gupta, V.S.; Aggarwal, R.K.; Ranjekar, P.K.; Brar, D.S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.* **2000**, *100*, 1311–1320.
29. Faleiro, F.G. *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*, Embrapa Cerrados: Planaltina, Brasil, 2007.
30. Manel, S.; Schwartz, M.K.; Luikart, G.; Taberlet, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* **2003**, *18*, 189-197.
31. Chase, M.W.; Hills, H.G. Silica gel: an ideal material for field preservation of samples for DNA studies. *Taxon* **1991**, *40*, 215–220.
32. Doyle, J.J.; Dickson, E.E. Preservation of Plant Samples for DNA Restriction Endonuclease Analysis. *Taxon* **1987**, *36*: 715–722.
33. NAPS Unit Standard Primers 5'-3'. Disponível online: https://web.archive.org/web/20061002050553/http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/Primers.pdf (acessado em 25 de fevereiro de 2018).
34. Al-Otaibi, S. A. Genetic variability in mite-resistant honeybee using ISSR molecular markers. *Arab. J. Biotechnol.* **2008**, *11*: 241–252.
35. Ribeiro, P.C.C.; Pinheiro, L.C.; Domingues, R.; Forzza, R.C.; Machado, M.A.; Viccini, L.F. Genetic diversity of *Vriesea cacuminis* (Bromeliaceae): an

- endangered and endemic Brazilian species. *Gen. Mol. Res.* **2013**, 12, 1934–1943.
36. Vieira, S.D.; Rabbani, A.R.C.; Santos, F.; Silva-Mann, R.; Arrigoni-Blank, M.F.; Prata, A.P.N.; Resende, L.V.; Pasqual, M.; Blank, A.F. Molecular characterization of bromeliads from northeast Brazil. *Gen. Mol. Res.* **2014**, 13, 9851–9860.
37. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W.; NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, 9.
38. Jaccard, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* **1908**, 44, 223–270.
39. Sokal, R.; Michener, C. "A statistical method for evaluating systematic relationships". *University of Kansas Science Bulletin* **1958**, 38: 1409–1438.
40. Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontol. Electron.* **2001**, 4: 1– 9.
41. Cruz, C.D. Programa Genes, análise multivariada e simulação. Biodata – Rede de Pesquisa em Biometria e Estatística DA UFV. Disponível online: <http://arquivo.ufv.br/dbg/genes/gdown1.htm> (Acessado 28 de fevereiro de 2019).
42. Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1973**, 70, 3321–3323.
43. Shannon, C.E. A mathematical theory of communication. *Syst. Tech. J.* **1948**, 27,379–423.

44. Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **1980**, *32*, 314–331.
45. Quantum GIS geographic information system 3.0. Disponível online: https://www.qgis.org/pt_BR/site/forusers/download.html (acessado 20 de fevereiro de 2019).
46. Olson, D.M.; Dinerstein, E.; Wikramanayake, E.D.; Burgess, N.D.; Powell, G.V.N.; Underwood, E.C.; D’amico, J.A.; Itoua, I.; Strand, H.E.; Morrison, J.C.; Loucks, C.J.; Allnutt, T.F.; Ricketts, T.H.; Kura, Y., Lamoreux, J.F.; Wetengel, W.W.; Hedao, P.; Kassem, K.R. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth, a new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity. *BioScience* **2001**, *51*, 933–938.
47. Veloso, H.P.; Rangel-Filho, A.L.R.; Lima, J.C.A. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um Sistema Universal*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, Brasil, 1991.
48. Hasenack, H.; Weber, E.; Boldrini, I.I.; Trevisan, R. *Mapa de sistemas ecológicos da ecorregião das savanas uruguaias em escala 1: 500.000 ou superior e relatório técnico descrevendo insumos utilizados e metodologia de elaboração do mapa de sistemas ecológicos*, Centro de Ecologia (UFRGS): Porto Alegre, Brasil, 2010.
49. Guyra Paraguay: Layer Gran Chaco deforestation. Disponível online: http://data.globalforestwatch.org/datasets/3d668cf0fbc415bba1ec00bc6263877_5?selectedAtribute=date. (Acessado 29 de fevereiro de 2019).

50. Projeto Monitoramento do Desmatamento dos Biomas Brasileiros. Disponível online: <http://mapas.mma.gov.br/i3geo/datadownload.htm> (Acessado 20 de fevereiro de 2019).
51. Nei, M. *Molecular evolutionary genetics*, Nova Iorque, Estados Unidos, 1987.
52. Damasceno, J.O.; Ruas, E.A.; Rodrigues, L.A.; Ruas, C.F.; Bianchini, E.; Pimenta, J. A.; Ruas, P.M. Genetic differentiation in *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae) over a short geographic distance as assessed by AFLP markers. *Gen. Mol. Res.* **2011**, 10, 1180–1187.
53. Ferreira-Ramos, R.; Monteiro, M.; Zucchi, M.I.; Pinheiro, J.B.; Martinez, C.A.; Mestriner, M.A.; Alzate-Marin, A.L. Microsatellite markers for *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae), an endangered tropical tree species. *Am. J. Bot.* **2011**, 300–302.
54. Zimback, L.; Mori, E. S.; Kageyama, P. Y.; Hideyo, A. O. K. I. Genetic structure of *Aspidosperma polyneuron* in the State of São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Flor.* **2011**, 23, 265–277.
55. Schumutz, J. Phytochemische betrachtungen zum genus *Apidosperma*. *Pharm. Acta Rely.* **1960**, 36, 103–118.
56. Molinari, H.B.; Crochemore, M.L. Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. para análises PCR-RAPD. *Rev. Bras. Fruti.* **2001**, 23, 447–450.
57. Sahu, S.K.; Thangaraj, M.; Kathiresan, K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Mol. Bio.* **2012**, 2012.
58. Freitas, A.D.D. Aspectos tecnológicos e moreoanatômicos de sementes maduras, lântulas e plantas jovens de *Aspidosperma spruceanum* Benth. Ex mull. arg.

- (Apocynaceae). Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica Tropical), Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2008.
59. Demeke, T.; Adams, R.P. The effect of plant polysaccharides and buffer additives of PCR. *BioTechniques* **1992**, 12, 332–334.
60. Fang, G.; Hammar, S.; Grumet, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* **1992**, 13, 52–54.
61. Becker, K.; Makkar, H.P.S. Effects of tannic acid and quebracho tannin on growth performance and metabolic rates of common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Aquaculture* **1999**, 175, 327–335.
62. Katterman, F.R.; Shattuck, V.I. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. *Prep. Biochem.* **1983**, 13, 347–359.
63. Sarwat, M.; Singh Negi, M.; Lakshmikumaran, M.; Kumar Tyagi, A.; Das, S.; Shankar Srivastava, P. A standardized protocol for genomic DNA isolation from *Terminalia arjuna* for genetic diversity analysis. *Electron. J. Biotechnol.* **2006**, 9, 86–91.
64. Vekemans X.; Hardy, O.J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol. Ecol.* **2004**, 13, 921–935.
65. Wright, S. Isolation by distance. *Genetics* **1943**, 28, 114.
66. Riveros, F. The Gran Chaco. *FAO* **2005**, 6, 1–42.
67. Howe, H.F.; Smallwood, J. Ecology of seed dispersal. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **1982**, 13, 201–228.

68. Hamrick, J.L.; Murawski, D. A.; Nason, J. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio* **1993**, 107, 281–297.
69. Lin, S.; Bernardello, G. Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. *Int. J. Plant Sci.* **1999**, 160, 869–878
70. Vieira, M.F.; Grabalos, R. Sistema reprodutivo de *Oxypetalum mexiae* Malme (Asclepiadaceae), espécie endêmica de Viçosa, MG, Brasil, em perigo de extinção. *Acta Bot. Bras.* **2003**, 17, 137–145.
71. Löhne, C.; Machado, I. C.; Porembski, S.; Erbar, C.; Leins, P. Pollination biology of a *Mandevilla* species (Apocynaceae), characteristic of NE-Brazilian inselberg vegetation. *Bot. Jahrb. Syst.* **2004**, 125(2), 229–243.
72. Darrault, R.O.; Schlindwein, C. Limited Fruit Production in *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) and Pollination by Nocturnal and Diurnal Insects. *Biotropica* **2005**, 37, 381–388.
73. Pollak, E. On the theory of partially inbreeding finite populations. I. Partial selfing. *Genetics* **1987**, 117, 353–360
74. Schoen, D.J.; Brown, A.H.D. Intraspecific variation in population gene diversity and effective population size correlates with the mating system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1991**, 88, 4494–4497.
75. Hamrick, J.L.; Godt, M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Proc Biol Sci.* **1996**, 351, 1291–1298.
76. Glémin, S; Bazin, E; Charlesworth, D. Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. *Proc Biol Sci.* **2006**, 273, 3011–3019.

77. Kaye, T. N. From flowering to dispersal: reproductive ecology of an endemic plant, *Astragalus australis* var. *olympicus* (Fabaceae). *Am. J. Bot.* **1999**, 86, 1248–1256.
78. Aizen, M.A.; Feinsinger, P. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. *Ecology* **1994**, 75, 330–351.
79. Caballero, J.; Palacios, F.; Arévalos, F.; Rodas, O.; Yanosky, A. Cambio de uso de la tierra en el Gran Chaco Americano en el año 2013. *Paraquaria Natural* **2014**, 2, 21–28.
80. Caldas, M.M.; Goodin, D.; Sherwood, S.; Campos Krauer, J. M.; Wisely, S. M. Land-cover change in the Paraguayan Chaco: 2000–2011. *J. Land Use Sci.* **2013**, 10, 1–8.
81. Da Cunha, N.G.; Da Silveira, R.J.C.; Mendes, R.G.; Pereira, M.R. *Estudo de solos do Município de Barra do Quaraí-RS*. Embrapa Clima Temperado: Pelotas, Brasil, 2001.
82. Costa, D.F.D.; Vieira, F.D.A.; Fajardo, C.G.; Chagas, K.P.T.D. Genetic diversity and ISSR initiators selection in a natural population of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). *Rev. Bras. Fruti.* **2015**, 37, 970–976.
83. Hartl, D.L.; Clark, A.G. *Principles of population genetics*. Sunderland, 4^a Ed.; Sinauer associates: Massachusetts, Estados Unidos, **1997**.
84. Kageyama, P.Y.; Gandara, F.B.; Souza, L.D. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série Técnica IPEF* **1998**, 12, 65–70.
85. Watson, I.W.; Westoby, M.; Holm A. McR. Continuous and episodic components of demographic change in arid zone shrubs: models of two

- Eremophila* species from Western Australia compared to published data on other species. *J. Ecol.* **1997**, 85, 833–46.
86. Dodd G.L.; Donovan L. A. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. *Am. J. Bot.* **1999**, 86, 1146–53.
87. Barchuk, A.H.; Díaz, M.P. Regeneration and structure of *Aspidosperma quebracho-blanco* Schl. in the Arid Chaco (Córdoba, Argentina). *For. Policy. Econ.* **1999**, 118, 31–36.
88. Cloutier, D.; Kanashiro, M.; Ciampi, A.Y.; Schoen, D.J. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. *Mol. Ecol.* **2007**, 16, 797–809.
89. Grau, R; Gasparri, I; Aide, B.T.M. Agriculture expansion and deforestation in seasonally dry forests of northwest Argentina. *Environ. Conserv.* **2005**, 32, 140–148.
90. Zak, M.R.; Cabido, M.; Hodgson, J.G. Do subtropical seasonal forests in the Gran Chaco, Argentina, have a future? *Biol. Conserv.* **2004**, 120, 589–598.
91. Vieira, F.A.; Carvalho, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. *Bio. Cons.*, **2008**, 17, 2305-2321.
92. Gibb, H.; H., Dieter, F. Habitat fragmentation in an urban environment: large and small fragments support different arthropod assemblages. *Bio. Cons.* **2002**, 06, 91–100.
93. Mace, G.M.; Collar N.J.; Gaston, K.J.; Hilton-Taylor C.; Akçakaya, H.R.; Leader-Williams, N.; Milner-Gulland, E.J.; Stuart, S.N. Quantification of extinction risk: IUCN's system for classifying threatened species. *Conserv. Biol.* **2008**, 6, 1424-1442

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Padrão de fragmentos gerados nas ampliações com marcadores ISSR em amostras de *A. quebracho-blanco* (Primer No.7, UBC 808, 856, 857, 888 e 842). Marcadores de peso molecular 1Kb (MM).

Figura 2. Dendrograma UPGMA das populações de *A. quebracho-blanco* amostradas, considerando como complemento aritmético o índice de Jaccard. Ramo I: (FOR e FIL), Ramo II: (COB e BAQ), Ramo III (PMU).

Figura 3. Dendrograma UPGMA dos 25 indivíduos de *A. quebracho-blanco* amostrados, considerando como complemento aritmético o índice de Jaccard. Porto Murтинho, Brasil (PMU), Filadélfia, Paraguai (FIL), Formosa, Argentina (FOR), Córdoba, Argentina (COB), Barra do Quaraí, Brasil (BAQ).

Figura 4. Índice de Shannon (H'), diversidade genética de Nei (N_e), para as cinco populações nativas de *Aspidosperma quebracho-blanco*. Porto Murтинho, Brasil (PMU), Filadélfia, Paraguai (FIL), Formosa, Argentina (FOR), Córdoba, Argentina (COB), Barra do Quaraí, Brasil (BAQ).

Figura 5. Distribuição das populações amostradas nas limitações de vegetação chaquenha (Olson et al., 2001; Hasenack et al., 2010; Veloso et al. 1991); Mapeamento da antropização nas proximidades da Savana Estépica e desmatamento no Chaco, relacionados com as populações amostradas: 1-PMU – Porto Murтинho, Brasil; 2- FIL-

Filadélfia, Argentina; 3- FOR-Formosa, Argentina; 4-COB-Córdoba, Argentina, 5-
BAQ, Barra do Quaraí, Brasil; Software QGIS® 3.0 (QGIS, 2011).

Anexo 1. Origens geográficas e informações dos vouchers de materiais testemunho
de *Aspidosperma quebracho-blanco* de cada população analisada no presente estudo.

Tabela 1. Dados das populações de *Aspidosperma quebracho-blanco* amostradas.

População	Coordenadas	Código da pop.
Barra do Quaraí (Brasil)	30°11'31,7"S 57°31'21,3"O	BAQ
Córdoba (Argentina)	31°22'32,8"S 65°28'48,2"O	COB
Filadélfia (Paraguai)	22°35'52,0"S 59°56'43,0"O	FIL
Formosa (Argentina)	24°40'37,5"S 60°36'27,9"O	FOR
Porto Murtinho (Brasil)	21°39'15,8"S 57°49'50,8"O	PMU

Tabela 2. Teste de amplificação de primers de ISSR em *A. quebracho-blanco*.

Primers ISSR	Amplificação	Sequência 5' para 3'	Referência
Primer No. 12	F	TCCTCCTCCTCCTCCGT	Al-Otaibi (2008)
Primer No. 16	+	ACACACACACACACACYT	Al-Otaibi (2008)
Primer No.7	+*	AGACAGACAGACAGACGC	Al-Otaibi (2008)
UBC 807	-	AGAGAGAGAGAGAGAGT	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 808	+*	AGAGAGAGAGAGAGAGC	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 810	+	GAGAGAGAGAGAGAGAT	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 811	-	GAGAGAGAGAGAGAGAC	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 812	-	GAGAGAGAGAGAGAGAA	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 813	-	CTCTCTCTCTCTCTT	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 815	-	CTCTCTCTCTCTCTG	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 818	-	CACACACACACACACAG	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 820	-	GTGTGTGTGTGTGTGTC	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 823	F	TCTCTCTCTCTCTCTCC	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 824	-	TCTCTCTCTCTCTCTCG	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 827	-	ACACACACACACACAG	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 834	+	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 835	-	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 836	+	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 840	+	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 841	+	GAGAGAGAGAGAGAGACTC	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 842	+*	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 844	-	CTCTCTCTCTCTCTRC	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 845	F	CTCTCTCTCTCTCTRG	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 848	-	CACACACACACACACARG	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 850	-	GTGTGTGTGTGTGTGYC	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 851	-	GTGTGTGTGTGTGTGYG	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 855	F	ACACACACACACACACCTT	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 856	+*	ACACACACACACACACYA	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 857	+*	ACACACACACACACACYG	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 866	-	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 888	+*	BDBCACACACACACACA	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 889	+	AGTCGTAGTACACACACACAC	NAPS Unit Standard Primers (2006)
UBC 891	-	HVHTGTGTGTGTGTGTG	NAPS Unit Standard Primers (2006)

(+) Amplificação bem sucedida; (+*) *loci* polimórficos usados nas análises de populações; (-) Amplificação sem êxito; (F) ampliações fracas; R=A ou G; Y= C ou T; B= G, T ou C; D=G, A ou T; H=A, C ou T; V=G, C ou A.

Tabela 3. Matriz de similaridade genética entre as populações de *A. quebracho-blanco*, considerando como complemento aritmético o índice de Jaccard [38]. Formosa (FOR); Filadélfia (FIL); Córdoba (COR); Porto Murinho (PM); Barra do Quaraí (BQ).

	PMU	FOR	FIL	COB
FOR	0,42			
FIL	0,41	0,55		
COB	0,31	0,47	0,42	
BAQ	0,26	0,46	0,36	0,51

Tabela 4. Coeficiente da matriz de similaridade entre os indivíduos amostrados, considerando como complemento aritmético o índice de Jaccard [38].

	PMU					FOR					FIL					COB					BAQ				
	1	2	3	4	7	11	12	13	15	16	11	12	13	14	16	4	12	13	14	15	11	12	13	14	
PMU 1																									
PMU 2	0,00																								
PMU 3	0,00	0,19																							
PMU 4	0,11	0,17	0,48																						
PMU 7	0,08	0,08	0,44	0,58																					
FOR11	0,14	0,00	0,16	0,35	0,33																				
FOR12	0,16	0,16	0,25	0,37	0,45	0,39																			
FOR13	0,09	0,09	0,42	0,50	0,63	0,36	0,54																		
FOR15	0,08	0,08	0,56	0,64	0,77	0,33	0,50	0,76																	
FOR16	0,10	0,16	0,30	0,48	0,56	0,33	0,58	0,60	0,56																
FIL11	0,00	0,00	0,00	0,16	0,08	0,31	0,15	0,09	0,08	0,10															
FIL12	0,00	0,18	0,38	0,35	0,48	0,25	0,50	0,41	0,48	0,44	0,11														
FIL13	0,13	0,13	0,33	0,62	0,52	0,32	0,43	0,55	0,57	0,54	0,08	0,41													
FIL14	0,13	0,13	0,34	0,58	0,59	0,29	0,56	0,52	0,64	0,62	0,08	0,54	0,81												
FIL16	0,13	0,13	0,39	0,52	0,59	0,33	0,62	0,57	0,64	0,62	0,08	0,60	0,74	0,92											
COB4	0,16	0,00	0,21	0,48	0,50	0,52	0,46	0,38	0,50	0,41	0,21	0,24	0,48	0,50	0,45										
COB12	0,14	0,09	0,27	0,54	0,55	0,46	0,58	0,48	0,55	0,52	0,18	0,34	0,53	0,55	0,78										
COB13	0,14	0,14	0,32	0,56	0,47	0,36	0,48	0,35	0,42	0,43	0,14	0,36	0,50	0,47	0,60	0,65									
COB14	0,14	0,14	0,31	0,54	0,50	0,40	0,52	0,43	0,50	0,46	0,13	0,34	0,53	0,50	0,50	0,64	0,63	0,79							
COB15	0,16	0,10	0,30	0,61	0,40	0,33	0,41	0,43	0,50	0,46	0,15	0,29	0,59	0,56	0,50	0,58	0,52	0,67	0,78						
BAQ11	0,09	0,04	0,28	0,44	0,47	0,36	0,43	0,35	0,47	0,33	0,14	0,23	0,45	0,42	0,42	0,60	0,59	0,50	0,54	0,43					
BAQ12	0,16	0,05	0,25	0,42	0,45	0,28	0,46	0,38	0,50	0,41	0,10	0,24	0,48	0,56	0,50	0,65	0,64	0,43	0,46	0,41	0,60				
BAQ13	0,09	0,09	0,28	0,44	0,47	0,31	0,48	0,50	0,52	0,43	0,19	0,31	0,50	0,52	0,52	0,54	0,54	0,40	0,54	0,48	0,62	0,54			
BAQ14	0,10	0,10	0,33	0,41	0,48	0,22	0,50	0,52	0,54	0,50	0,14	0,32	0,42	0,48	0,54	0,39	0,45	0,41	0,45	0,44	0,58	0,44	0,71		
BAQ15	0,11	0,11	0,27	0,46	0,43	0,20	0,33	0,52	0,48	0,44	0,17	0,21	0,52	0,43	0,43	0,38	0,50	0,41	0,44	0,50	0,52	0,38	0,58	0,68	

Tabela 5. Valores de frequência de alelos obtidos e heterozigose (H) de acordo com as populações de *Aspidosperma quebracho-blanco* amostradas com o software Genes® (Cruz 2006).

População	f(A)	f(a)	H=2pq
PMU	0,1	0,9	0,18
FOR	0,15	0,85	0,26
FIL	0,15	0,85	0,25
COB	0,17	0,83	0,28
BAQ	0,18	0,82	0,26

Tabela 6. Padrões de conteúdo de informação polimórfica (PIC), que varia de 0 a 0,5 em marcadores dominantes[44] e a heterozigose a partir de dados binários[41] obtido com os acessos dos 6 marcadores testados no software Genes® (Cruz 2006).

População	Marcador	A-	aa	f(A)	f(a)	H=2pq	PIC
PMU	Primer No.7	16	39	0,1579	0,8421	0,266	0,2306
FOR	Primer No.7	14	41	0,1366	0,8634	0,2359	0,2081
FIL	Primer No.7	15	40	0,1472	0,8528	0,2511	0,2195
COB	Primer No.7	19	36	0,191	0,809	0,309	0,2613
BAQ	Primer No.7	28	27	0,2994	0,7006	0,4195	0,3315
PMU	UBC 808	17	38	0,1688	0,8312	0,2806	0,2412
FOR	UBC 808	16	39	0,1579	0,8421	0,266	0,2306
FIL	UBC 808	17	38	0,1688	0,8312	0,2806	0,2412
COB	UBC 808	17	38	0,1688	0,8312	0,2806	0,2412
BAQ	UBC 808	13	42	0,1261	0,8739	0,2205	0,1962
PMU	UBC 842	10	45	0,0955	0,9045	0,1727	0,1578
FOR	UBC 842	13	42	0,1261	0,8739	0,2205	0,1962
FIL	UBC 842	13	42	0,1261	0,8739	0,2205	0,1962
COB	UBC 842	13	42	0,1261	0,8739	0,2205	0,1962
BAQ	UBC 842	4	51	0,037	0,963	0,0714	0,0688
PMU	UBC 856	7	48	0,0658	0,9342	0,1229	0,1154
FOR	UBC 856	20	35	0,2023	0,7977	0,3227	0,2706
FIL	UBC 856	14	41	0,1366	0,8634	0,2359	0,2081
COB	UBC 856	19	36	0,191	0,809	0,309	0,2613
BAQ	UBC 856	18	37	0,1798	0,8202	0,2949	0,2514
PMU	UBC 857	6	49	0,0561	0,9439	0,1059	0,1003
FOR	UBC 857	15	40	0,1472	0,8528	0,2511	0,2195
FIL	UBC 857	8	47	0,0756	0,9244	0,1397	0,13
COB	UBC 857	12	43	0,1158	0,8842	0,2048	0,1838
BAQ	UBC 857	15	40	0,1472	0,8528	0,2511	0,2195
PMU	UBC 888	7	48	0,0658	0,9342	0,1229	0,1154
FOR	UBC 888	17	38	0,1688	0,8312	0,2806	0,2412
FIL	UBC 888	24	31	0,2492	0,7508	0,3742	0,3042
COB	UBC 888	23	32	0,2372	0,7628	0,3619	0,2964
BAQ	UBC 888	20	35	0,2023	0,7977	0,3227	0,2706

Fig. 1

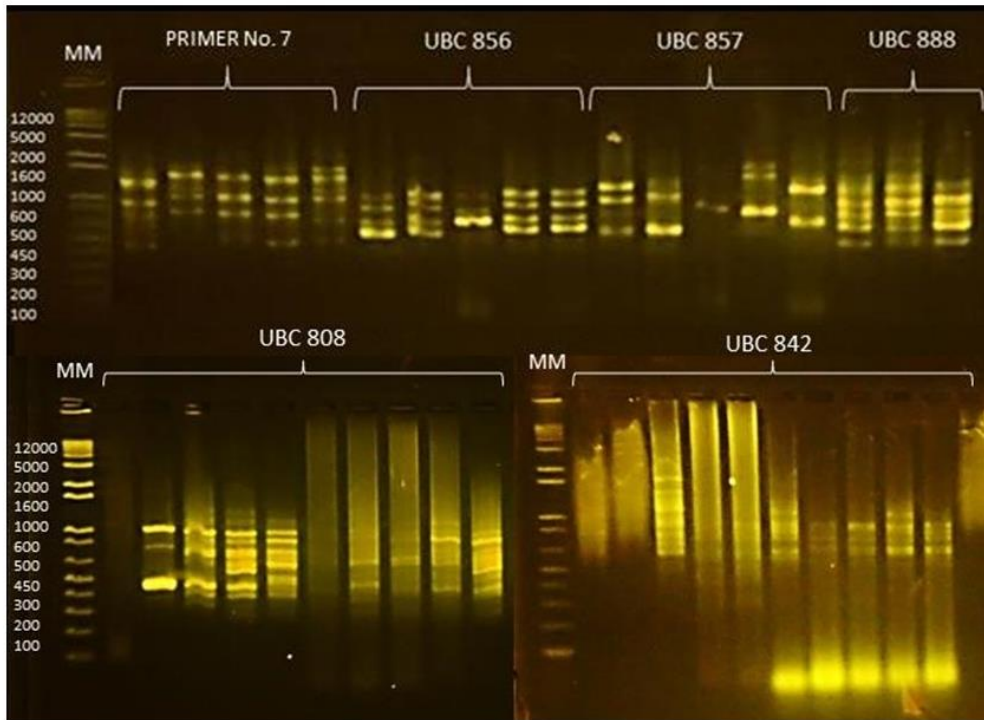


Fig. 2

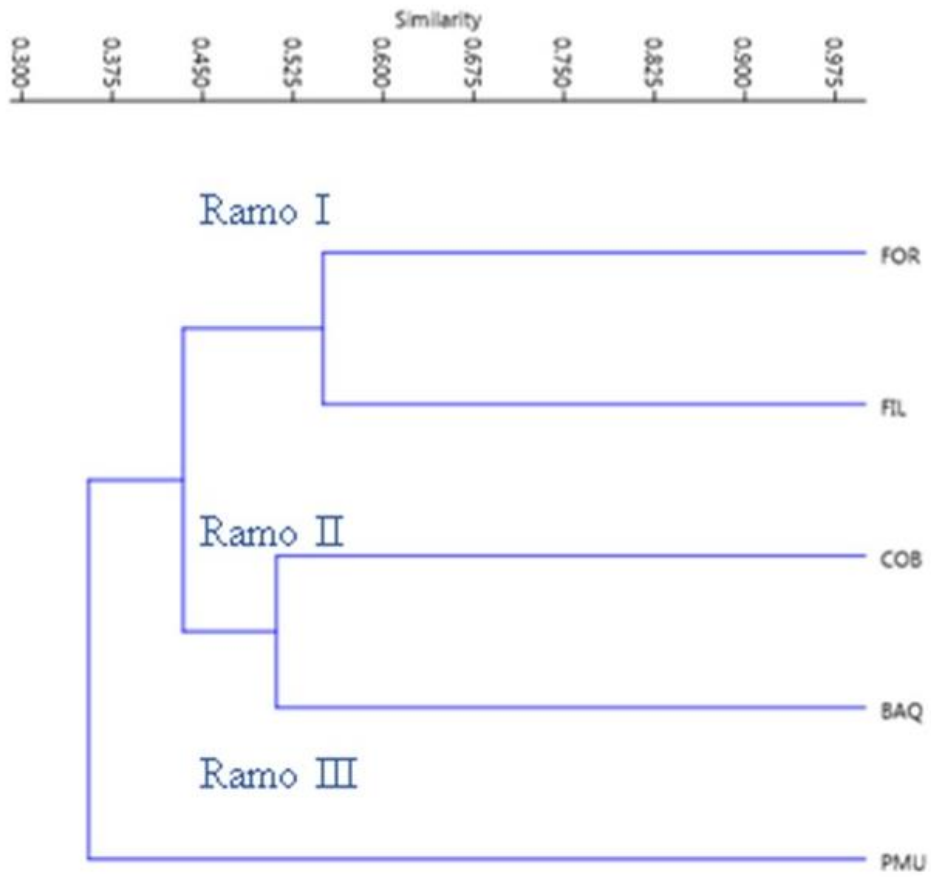


Fig. 3

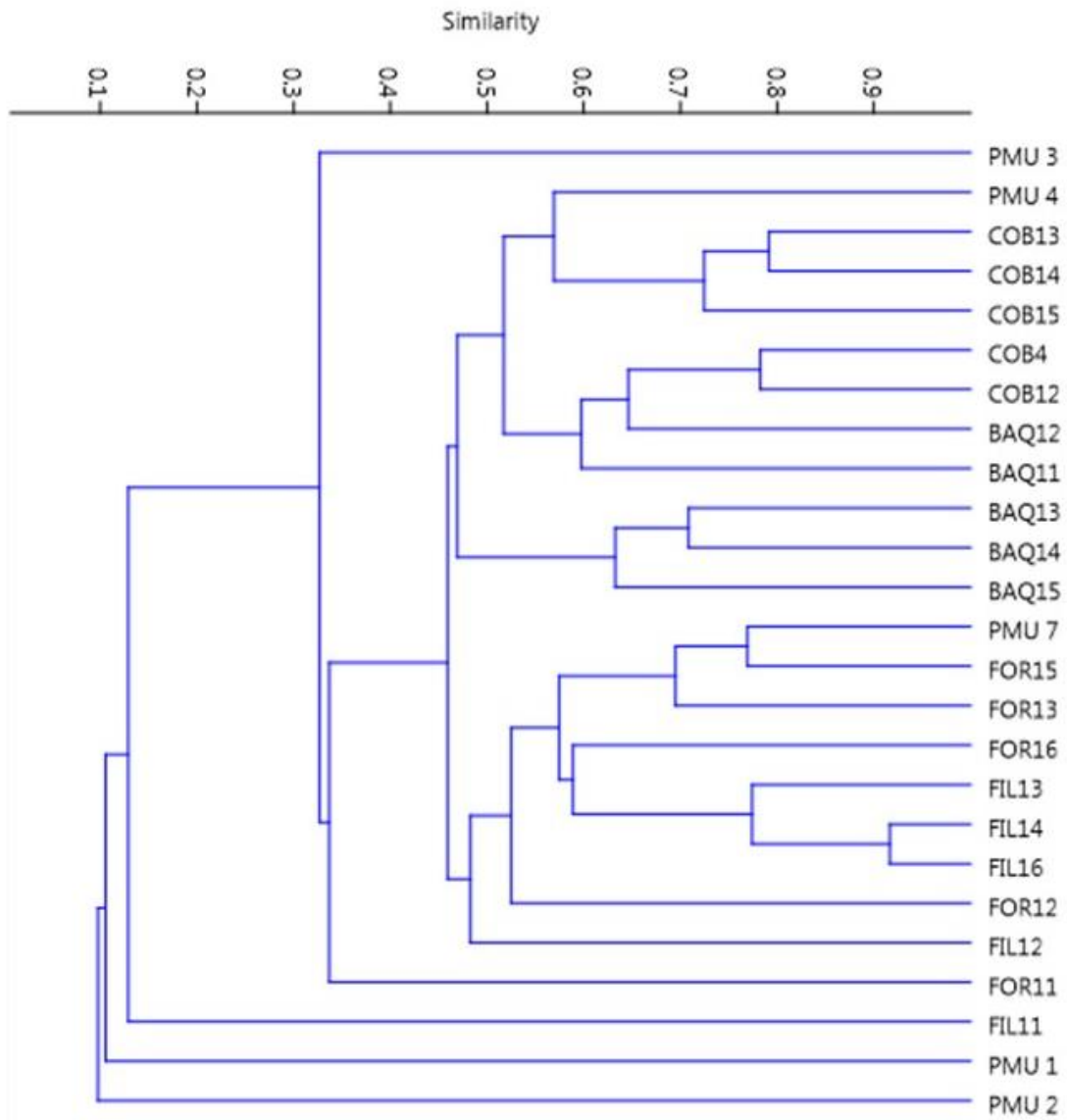


Fig. 4

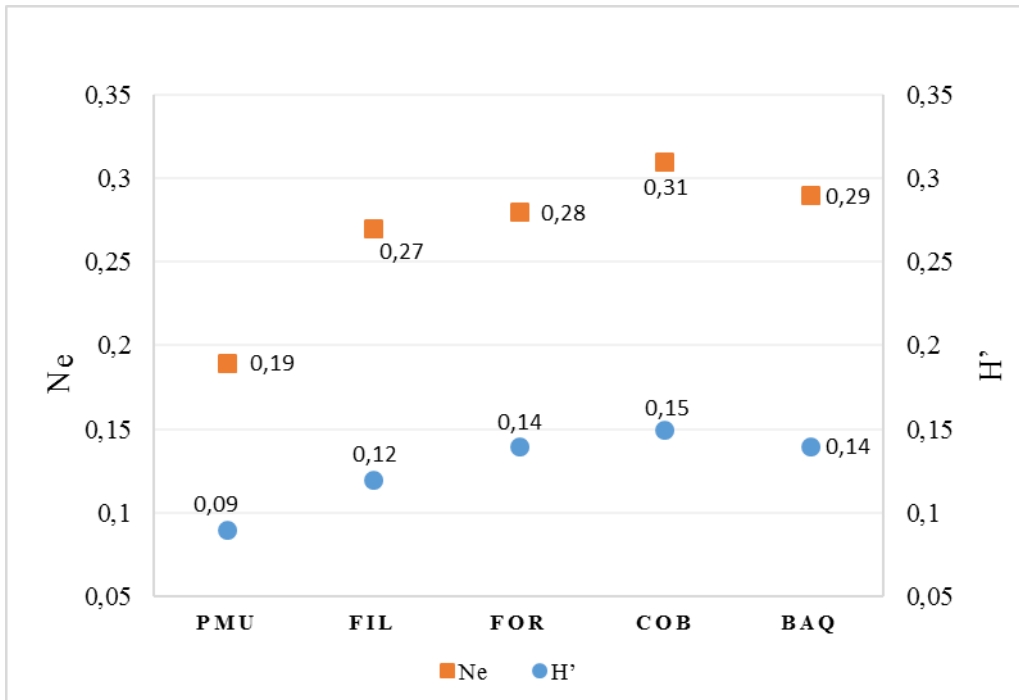
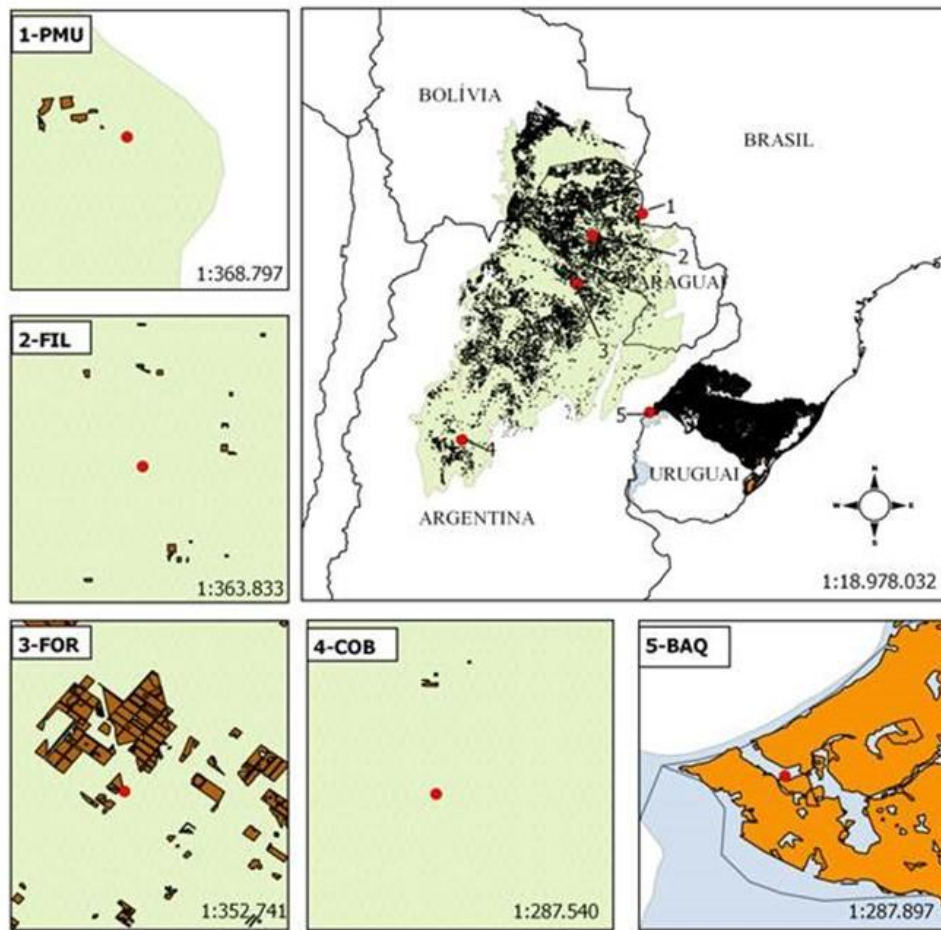


Fig. 5



Legenda

- Populações de *A. quebracho-blanco*
- Antropização nas proximidades da Savana Estépica
- Savana estépica
- Desmatamento no Chaco
- Chaco

Anexo 1. Origens geográficas e informações dos vouchers dos materiais testemunho de *Aspidosperma quebracho-blanco* de cada população analisada no presente estudo.

ESPÉCIME	VOUCHER	COORDENADAS	LOCALIDADE	CÓD. HERBÁRIO
<i>A. quebracho-blanco</i>	Farinaccio & Uchôa 1013	30°11'31,7"S 57°31'21,3"O	Barra do Quaraí (Brasil)	CGMS
<i>A. quebracho-blanco</i>	Cocucci 5680	31°22'5,46" S 65°28'08,04" O	Córdoba (Argentina)	CORD
<i>A. quebracho-blanco</i>	Vogt & Farinaccio 1709	22°36'03,1" S; 59°56'43,3" O	Filadenfia (Paraguai)	FACEN
<i>A. quebracho-blanco</i>	Farinaccio 1015	24°67'6,74" S 60°60'07,65" O	Formosa (Argentina)	CGMS
<i>A. quebracho-blanco</i>	Farinaccio 980	21°39'14,83" S 57°49'51,02" O	Porto Murtinho (Brasil)	CGMS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A necessidade de banco de germoplasmas para *A. quebracho-blanco* é vital para conservação genética da espécie, uma vez que suas origens geográficas são alvo de fortes pressões antrópicas. Em conjunto, os genótipos apresentam diversidade genética consideravelmente baixa, com boa parte dos alelos encontrados presentes população de Porto Murinho. Desta forma, a região precisa prioritariamente de uma unidade de conservação.

Além das estratégias de cunho genético e socioambiental, as regiões apresentam carência de atividades que conscientizem governantes e moradores a respeito do Chaco e a espécie estudada, trazendo pretextos para exploração indiscriminada dos mesmos. Os argumentos populares com aspectos negativos devem ser esclarecidos com discussões e apresentações de informações que comprovem a importância da região, incentivando a valorização das espécies deste ambiente, inclusive *A. quebracho-blanco*

Amparado pelos estudos sócio-históricos na região, a compilação de resultados obtidos mostra a importância de estabelecer relações entre os dados de geoprocessamento das áreas de amostradas aos estudos de diversidade genética, assegurando estratégias de conservação de forma mais precisa.