

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE NAOMI NAKAO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Butia paraguayensis* (Barb.Rodr.)
Bailey (ARECACEAE) NO CERRADO DO PLANALTO DE CAMPO MOURÃO**

**CAMPO MOURÃO
2022**

CAROLINE NAOMI NAKAO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Butia paraguayensis* (Barb.Rodr.)
Bailey (ARECACEAE) NO CERRADO DO PLANALTO DE CAMPO MOURÃO**

**Analysis of genetic variability of *Butia paraguayensis* (Barb.Rodr.) Bailey
(Arecaceae) in the Cerrado of Campo Mourão plateau**

Trabalho de conclusão de curso de graduação,
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Ambiental da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador: Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno

CAMPO MOURÃO

2022



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

CAROLINE NAOMI NAKAO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Butia paraguayensis* (Barb.Rodr.)
Bailey (ARECACEAE) NO CERRADO DO PLANALTO DE CAMPO MOURÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Ambiental da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 30/11/2022

Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Marcelo Galeazzi Caxambu
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dra. Raquel de Oliveira Bueno
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

CAMPO MOURÃO

2022

Dedico este trabalho à minha família, pela
paciência e apoio durante toda minha
trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pois nada disso seria possível sem sua benção.

Aos meus pais, Flávio e Elizabeth pelo constante incentivo e carinho. Aos meus tios e tias, sobretudo Edilson e Eduardo pelo amparo, minha eterna gratidão, tudo isso também é fruto de vocês.

A todos os professores e servidores da Universidade, mas principalmente ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno, pelas palavras de sabedoria e toda a bagagem de conhecimento que adquiri durante esses anos.

Aos meus irmãos Thaise e Matheus por sempre estarem ao meu lado. Aos meus avós, Antonia, Iorji, Laura. Ao meu finado avô Paulo, assim como meu padrinho José, saudades eternas.

À Yumi e Karine minhas melhores amigas e parceiras de laboratório. Ao Vini pela motivação e apoio. Aos calouros que fizeram parte do processo me auxiliando e a todos os meus amigos e familiares por sempre acreditarem no meu potencial.

Que estas poucas palavras expressem minha eterna gratidão por todas as pessoas que passaram pela minha vida e contribuíram de alguma forma para a elaboração desta pesquisa.

A harmonia da sociedade, como da
Natureza, consiste e depende da variedade
e antagonismo dos seus elementos e
caracteres.
(MARICÁ, M., 1967)

RESUMO

O seguinte estudo teve como objetivo analisar a variabilidade genética a partir de marcadores moleculares ISSR em indivíduos de *Butia paraguayensis* (Arecaceae) de grande importância histórico-cultural, devido a carência de dados genéticos da espécie para o município, sua classificação como ameaçada de extinção e a presença somente nos remanescentes de Cerrado para o estado do Paraná. Foram coletadas amostras foliares de vinte e quatro acessos em duas áreas distintas, o remanescente de Cerrado e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná. As amostras encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular passaram pelos processos de extração e purificação, reação em cadeia de polimerase e eletroforese, sendo analisadas estatisticamente quanto ao índice de conteúdo polimórfico dos primers, e índices de diversidade como a similaridade genética pelo índice de Jaccard, número de alelos observados e efetivos, diversidade genética de Nei e Shannon e sua correlação de distância genética e geográfica em teste de Mantel. Cinco primers obtiveram um bom padrão de amplificação com PIC variando entre 0,14 e 0,21 e temperaturas variando entre 46 °C e 54,8 °C. A média de alelos observada foi de 1,55 e a efetiva de 1,25. O índice de diversidade de Nei foi igual a 0,15 e o índice de Shannon igual a 0,23 indicando um baixo nível de diversidade assim como na taxa de polimorfismo (52%). A similaridade de Jaccard para as vinte e quatro amostras variou entre 0,0714 e 0,9167. O teste de Mantel revelou $r = 0,03$ resultando na distância geográfica como pouco significativa em relação a distância genética. A baixa variabilidade genética denota a importância de estudos complementares para manejos adequados dos indivíduos remanescentes de *B. paraguayensis* de Campo Mourão.

Palavras-chave: Arecaceae; diversidade genética; fluxo gênico; heterozigossidade.

ABSTRACT

The following study aimed to analyze the genetic variability from ISSR molecular markers in individuals of *Butia paraguayensis* (Arecaceae) of great historical and cultural importance, due to the lack of genetic data of the species for the county, its classification as endangered and the presence only in the Cerrado remnants for the state of Paraná. Leaf samples were collected from twenty-four accessions in two distinct areas, the Cerrado remnant and the Federal Technological University of Paraná. The samples sent to the Laboratory of Molecular Biology underwent extraction and purification processes, polymerase chain reaction and electrophoresis, being statistically analyzed for the polymorphic content of the primers, and diversity indexes such as genetic similarity by Jaccard index, number of observed and effective alleles, genetic diversity of Nei and Shannon and its genetic and geographical distance correlation in Mantel test. Five primers obtained a good amplification pattern with PIC ranging between 0.14 and 0.21 and temperatures ranging between 46 °C and 54.8 °C. The average observed allele count was 1.55 and the effective allele count was 1.25. The Nei diversity index was equal to 0.15 and the Shannon index equal to 0.23 indicating a low level of diversity as well as in the polymorphism rate (52%). Jaccard's similarity for the twenty-four samples ranged from 0.0714 to 0.9167. Mantel's test revealed $r = 0.03$ resulting in geographic distance as not very significant relative to genetic distance. The low genetic variability denotes the importance of further studies for adequate management of the remaining individuals of *B. paraguayensis* from Campo Mourão.

Keywords: Arecaceae; genetic diversity; gene flow; heterozygosity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Indivíduo de <i>Butia paraguayensis</i> (Barb.Rodr.) Bailey. A – Hábito. B – Caule.	14
Figura 2 - Fluxograma da metodologia aplicada no estudo da variabilidade genética de <i>Butia paraguayensis</i> (Barb.Rodr.) Bailey.	19
Figura 3 – Distância e Localização das áreas amostrais dos 24 indivíduos de <i>Butia paraguayensis</i> (Barb.Rodr.) Bailey. A – Distância entre os pontos amostrais; B - Universidade Tecnológica Federal do Paraná; C - Lote 7H.	21
Figura 4 – Padrão de amplificação dos indivíduos de <i>Butia paraguayensis</i> (Barb.Rodr.) Bailey em gel de agarose. A – ISSR 4. B – ISSR 7. C – ISSR 8. D – ISSR 10. E – ISSR 14.	25
Figura 5 – Dendrograma de similaridade de acordo com coeficiente de Jaccard para os 24 acessos de <i>Butia paraguayensis</i> (Barb. Rodr.) Bailey do município de Campo Mourão, Paraná.	29
Figura 6 – Gráfico de correlação entre distância genética (y) e distância geográfica (x) a partir do Teste de Mantel para os 24 acessos de <i>Butia paraguayensis</i> (Barb. Rodr.) Bailey.	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo Geral	12
2.1.1	Objetivos Específicos	12
3	JUSTIFICATIVA	13
4	REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1	Caracterização da espécie <i>Butia paraguayensis</i> (Barb.Rodr.) Bailey (Arecaceae)	14
4.2	Expansão Urbana e Fragmentação de Habitats	15
4.3	Biotecnologia e a Genética para Conservação	17
4.3.1	Diversidade Genética e a técnica de marcadores moleculares	17
5	MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1	Caracterização da área de estudo	20
5.2	Áreas de amostragem	20
5.3	Extração e purificação	22
5.4	Reação em cadeia de Polimerase e Eletroforese	22
5.5	Análise de dados	24
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
7	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade brasileira é amplamente variada, possuindo dois de seus biomas, Cerrado e Mata Atlântica entre os 36 hotspots globais existentes, evidenciando sua vulnerabilidade quanto às altas taxas de endemismo e os riscos aos ecossistemas devido a degradação natural dos habitats e, sobretudo, a aceleração antrópica perante a expansão territorial e o desenvolvimento econômico. (MITTERMEIER et al., 2011, NOSS, 2016).

Tal perda de vegetação natural frente à expansão de matrizes de uso da terra afetou ambos os domínios drasticamente nas últimas décadas. Em áreas de Cerrado, segundo Machado et al. (2004), estima-se que aproximadamente 55% do território original fora desmatado ou modificado até o ano de 2002, gerando fragmentações capazes de alterar a dinamicidade do ecossistema e influenciar na ocorrência de espécies. Na bacia do Rio Mourão, mais de 97% do território do domínio Mata Atlântica se encontra intensamente fragmentado com áreas inferiores a 50ha, enquanto as áreas de Cerrado existentes, são representadas por apenas três pequenos fragmentos fracionados entre os 8.6ha remanescentes (FERREIRA et al., 2019; TOMADON et al., 2019).

A família Arecaceae possui um papel de importância no desempenho do ambiente em que se impregna principalmente pelo fato de seus frutos possuírem um alto teor energético pela composição rica em lipídios e açúcares e pelo tempo de sua oferta auxiliando na alimentação da fauna silvestre em períodos de escassez de alimentos (PALEARI, 2012).

Butia paraguayensis (Barb.Rodr.) Bailey, o Butiá do Cerrado, representa uma espécie dos 185 gêneros da família Arecaceae (THE PLANT LIST, 2020), sendo de extrema importância, sobretudo no sul do Brasil, pela relação histórico-cultural, por seu valor paisagístico devido ao apreço em cultivo ornamental, além de seu valor econômico, servindo de matéria-prima na produção de alimentos, bebidas e na confecção de artesanatos (BÜTTOW et al., 2009).

Frente às pressões antrópicas nos últimos anos e devido a utilização dos recursos da biodiversidade existente de forma direta e indireta, a conservação ambiental tem se destacado como uma questão de extrema relevância, que, aliada ao desenvolvimento tecnológico e avanços nas pesquisas juntamente com recursos da

biotecnologia, tem auxiliado na gestão da diversidade genética de espécies (CRUZ-CRUZ; GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013).

Compreender o ambiente e a dinâmica de uma espécie é extremamente importante na caracterização genética populacional, disseminada a partir de técnicas eficientes da biologia molecular, sendo a Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) um método de marcador molecular eficaz e com baixo custo na detecção de polimorfismos existentes já aplicados em estudos de espécies pertencentes à família *Arecaceae*, possibilitando informações significativas para a elaboração de estratégias voltadas à conservação das espécies existentes (NEVES et al., 2019; SANTOS J. et al., 2020; SANTOS S. et al., 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar e analisar a variabilidade genética de indivíduos de *Butia paraguayensis* (Barb.Rodr.) Bailey, existentes no município de Campo Mourão, Paraná.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Coletar indivíduos de remanescentes existentes na região urbana de Campo Mourão;
- Selecionar *primers* ISSR e testar temperaturas adequadas de anelamento em PCR para a espécie;
- Verificar a estrutura genética dos acessos de Butiás coletados e as relações entre as unidades amostrais genética e geograficamente.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos acerca da Biodiversidade permanecem em estágio exploratório, especialmente quanto à flora, visto a ampla gama florística do Brasil frente ao mundo (cerca de 19% da flora mundial) (GIULIETTI et al., 2005). Entre os diversos eventos realizados quanto aos projetos de conservação da diversidade biológica brasileira, o direcionamento na identificação de áreas prioritárias para conservação é ressaltado visto a falta de informação biológica e a necessidade de inventários dessas áreas pouco conhecidas, cuja taxa de endemismo e grau de ameaça são consideráveis (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002).

Segundo Callenbach (2001), proteger a biodiversidade de ecossistemas auxilia na preservação de espécies ameaçadas, e esse progresso na conservação da biodiversidade brasileira, de acordo com Giulietti et al. (2005), depende da identificação e inventário de coleções de DNA, sobretudo, dos hotspots existentes.

Visto a carência de dados do banco genético de *Butia paraguayensis* que se encontra somente nos remanescentes do cerrado mourãoense para o estado do Paraná (CAXAMBU et al., 2015) e sua presença na lista vermelha da flora do Paraná e do Rio Grande do Sul (HATSCHBACH; ZILLER, 1995; RIO GRANDE DO SUL, 2003; TOMADON et al., 2019), assim como o intenso processo de fragmentação do Planalto de Campo Mourão, onde se localizam enclaves de Cerrado (FERREIRA et al., 2019), denota-se a necessidade do fornecimento de dados moleculares para o estudo da variabilidade da espécie e seu status de conservação no município, podendo assim, exibir um panorama e auxiliar em futuros estudos e estratégias de conservação da espécie.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Caracterização da espécie *Butia paraguayensis* (Barb.Rodr.) Bailey (Arecaceae)

O gênero *Butia*, pertencente à família Arecaceae, reúne cerca de 20 espécies alocadas na América do Sul. *Butia paraguayensis*, também conhecida como Butiá, Butiazeiro do Cerrado e Butiá do Cerrado (LORENZI et al., 2010), é uma palmeira nativa cuja distribuição geográfica no Brasil compreende os estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul, encontrando-se presente também em outros países como Paraguai, Argentina e Uruguai (DEBLE et al., 2011; SOARES et al., 2014).

Os indivíduos dessa espécie são caracterizados pelo caule espesso (Figura 1) e sua altura, podendo atingir até 3 metros de comprimento de acordo com Lorenzi et al. (2010). Seus estipes são solitários com folhas pinadas pinatipartidas e flores sésseis, amarelas, esverdeadas ou arroxeadas, pistiladas e estaminadas na mesma inflorescência. Seus frutos são ovais ou cônicos, amarelos, esverdeados, avermelhados ou roxos, com coloração verde-amarelado à laranja quando maduros. (CAXAMBU et al., 2015; HEIDEN et al., 2020; SOARES et al., 2014).

Figura 1 - Indivíduo de *Butia paraguayensis* (Barb.Rodr.) Bailey. A – Hábito. B – Caule.



Fonte: Autoria própria (2022).

Comumente localizados em regiões planas, as formações agrupadas desse gênero são denominadas butiazais, abrangendo uma rica biodiversidade faunística e

florística associada (RIVAS; BARBIERI, 2014). Sua floração, de acordo com Caxambu et al. (2015) ocorre nos períodos de julho a janeiro e sua frutificação de dezembro a abril. Seus frutos, carnosos e ricos em vitamina C são registrados na dieta de animais como *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826), *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766), *Penelope obscura* Temminck, 1815, *Salvator merianae* Duméril & Bibron, 1839, *Cuniculus paca* (Linnaeus, 1766), *Procyon cancrivorus* Cuvier, 1798, *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814) e *Dasyprocta azarae* Lichtenstein, 1823, sendo estes exemplos de vertebrados que auxiliam na dispersão das sementes dos Butiás (AMAMOS..., 2005; CAXAMBU et al., 2015; ABREU et al., 2021).

Sua utilização e conhecimento remete desde períodos mais antigos, estando representado na cultura e no mercado de diversas regiões, dos tempos mais remotos aos atuais, desde a utilização de suas folhas para uso doméstico a partir de crinas vegetais, à comercialização de produtos oriundos dos frutos e de suas amêndoas, servindo o ramo alimentício, artesanal, de bebidas, além de fármacos e cosméticos. Além disso, destaca-se o valor ornamental atrelado pela sua utilização no paisagismo urbano e rural (RIVAS; BARBIERI, 2014).

4.2 Expansão Urbana e Fragmentação de Habitats

A dinâmica populacional, assim como o uso da terra conforme sua expansão, vêm alterando a paisagem cotidiana, levando à fragmentação de habitats e trazendo consigo mudanças negativas significativas aos ecossistemas, sobretudo nas características genéticas das populações remanescentes (SCHLAEPFER, 2018).

Lavery e Gibbs (2007), definem a fragmentação como a transformação da paisagem contínua de um ecossistema em unidades reduzidas e separadas entre partes, capaz de influenciar nas relações interespecíficas por meio da quebra na dinâmica entre a população de vegetações e animais, sendo um fator de impacto em muitos biomas do mundo.

O Cerrado, considerado o segundo maior Bioma brasileiro em extensão (MEIRA-NETO; SAPPORETTI-JR, 2002), ocupa aproximadamente 21% do território brasileiro, possuindo mais da metade dos originários 2 milhões de km² de extensão reduzida pela fragmentação decorrente da intensa intervenção humana (KLINK; MACHADO, 2005). Estima-se que durante os anos de 2002 a 2013, houve uma

supressão de 0,41% anual da cobertura vegetal natural das áreas de Cerrado existentes (SANO et al., 2019).

Para o estado do Paraná, a cobertura representa apenas 2% da área estadual (SANO et. al, 2008), onde, de acordo com Tomadon et al. (2019) são localizadas no sul do Brasil sob o domínio do Bioma Mata Atlântica, o qual o município do estudo se encontra inserido, a partir dos enclaves, termo utilizado para denominar agrupamentos de vegetações distintos às formações dominantes em seu entorno (LIBERALI, 2014). No município de Campo Mourão, de acordo com Monteiro, Parolin e Caxambu (2015), a pressão da expansão urbana frente ao desenvolvimento da cidade, levou a uma intensa desintegração da vegetação dos enclaves de Cerrado do município, restando apenas 0,7% da área original e dois fragmentos de destaque, a Estação Ecológica do Cerrado de Campo Mourão e o Lote 7-H.

4.3 Biotecnologia e a Genética para Conservação

Definida como uma atividade composta por tecnologias diversas de conhecimentos multidisciplinares, utilizadas na geração de produtos ou no auxílio para resolução de problemas, a biotecnologia tem emergido em estudos voltados à saúde, tanto humana quanto animal e vegetal, proporcionando suporte com suas técnicas e ampliando a compreensão acerca da biodiversidade de espécies (MALAJOVICH, 2011; ODALIA-RÍMOLI et al., 2000).

Atrelada a ela, estudos voltados a genética e à conservação ambiental, sobretudo a dados moleculares e a genética de populações, dão espaço à Genética da Conservação, área voltada a pesquisa científica aplicada, fundamentada numa junção interdisciplinar como ferramenta capaz de contribuir na preservação de espécies e populações (PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2003).

Tal ferramenta se baseia principalmente na análise da variabilidade alélica e genotípica de indivíduos, denominada diversidade genética, e nos estudos acerca dos aspectos e interações no ambiente, focando no fluxo gênico da espécie ou população, de forma a evitar a depressão endogâmica (depressão pelo cruzamento de indivíduos com parentesco próximo) (COSTA, 2018).

4.3.1 Diversidade Genética e a técnica de marcadores moleculares

Com a crescente preocupação quanto à biodiversidade e a necessidade de preservação de espécies frente a exploração econômica, aliadas aos avanços modernos da biotecnologia, algumas técnicas moleculares com capacidade de aplicação na caracterização da diversidade de espécies vem sendo utilizadas na complementação de estratégias clássicas como por exemplo a utilização de tecnologias de marcadores moleculares, diagnósticos moleculares, as tecnologias in vitro, ou até mesmo tecnologias de criopreservação (WEISING et al., 2005).

De acordo com Frankham, Ballou e Briscoe (2008), a diversidade genética retrata a assimetria no sequenciamento de nucleotídeos de um grupo de genes, pertencentes à locos com localizações específicas no DNA molecular, podendo ser avaliada a partir das técnicas de marcadores moleculares com a detecção de

polimorfismos, ou seja, a presença de diferentes fragmentos de DNA no mesmo loco, uma variação que permite diversidade nas espécies.

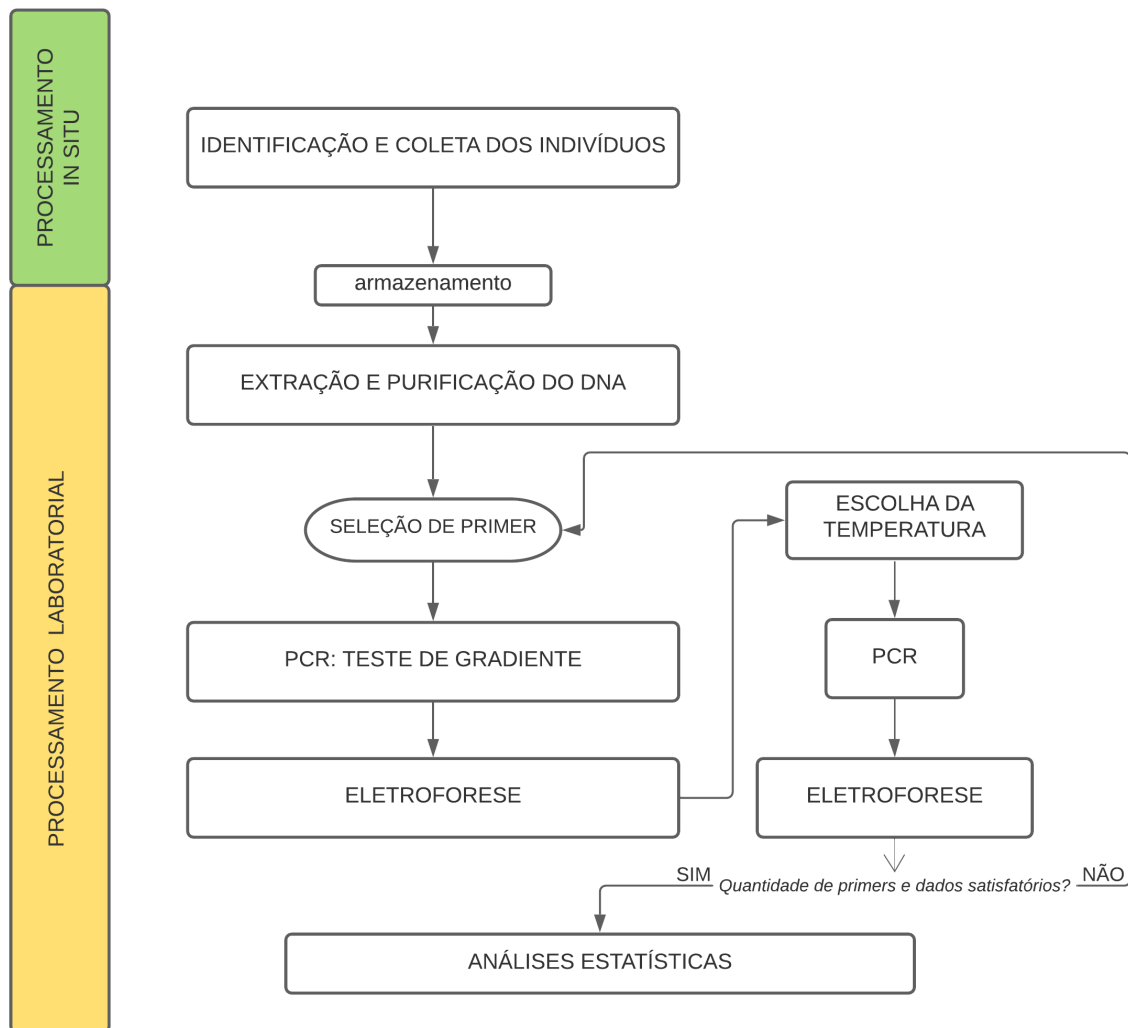
Marcadores moleculares são caracterizados pela herança alélica codominante/dominante. Marcadores codominantes facilitam a distinção de locos homozigotos e heterozigotos, enquanto marcadores dominantes apenas possibilitam a disposição (presença/ausência) de um alelo específico. Dentre os marcadores codominantes e dominantes mais utilizados em espécies vegetais, destacam-se respectivamente, os microssatélites, também denominada Short Tandem Repeats (STR's) e a Inter Simple Sequence Repeats (ISSR's) (NG; TAN, 2015).

Os ISSR são marcadores simples com fragmentos de amplitude variando de 100-3000 pares de base, com alta reprodutibilidade, capaz de explorar repetições de microssatélites sem informações anteriores do sequenciamento do DNA e eficaz na identificação de polimorfismos (ADHIKARI et al., 2017). Esta técnica é baseada no método da Polymerase Chain Reaction (PCR) e visam um único primer (16-20pb), podendo amplificar segmentos de DNA específicos para estudos de variabilidade genética devido à alta informatividade de bandas (NG; TAN, 2015).

5 MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento metodológico aplicado neste trabalho seguiu conforme o fluxograma disposto na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma da metodologia aplicada no estudo da variabilidade genética de *Butia paraguayensis* (Barb.Rodr.) Bailey.



Fonte: Autoria própria (2020)

5.1 Caracterização da área de estudo

O município de Campo Mourão localizado no estado do Paraná, pertence ao Terceiro Planalto Paranaense sob ponto fixo central na coordenada S 24° 02' 44" W 52° 22' 59", possui elevação de 585 metros de altitude (INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2020) e se encontra inserido na bacia do Rio Ivaí. Seu clima é classificado como Cfa, possuindo verões quentes com tendências de chuvas, geadas pouco frequentes e sem estações secas definidas (CAVIGLIONE et al., 2000). A região, considerada como área de ecótono, abrange as formações vegetais de Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila Mista e Savana, sendo este último representado pelos enclaves de Cerrado relictos do Quaternário (MAACK, 2002).

O município de interesse possui populações de Butiás cujas áreas definidas para a coleta foram o campus da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, área que comporta indivíduos resgatados de loteamentos do próprio município e o fragmento do lote 7H, remanescente da vegetação do bioma Cerrado, localizado às margens da Rodovia PR 158.

As áreas (Figura 3-A), encontram-se a uma distância aproximada de 6 km, sendo ambos os fragmentos cortados pela malha urbana.

5.2 Áreas de amostragem

Para a análise da variabilidade genética de *B. paraguayensis* foram realizadas as coletas de amostras foliares jovens, de aproximadamente 1 a 2 folíolos para cada indivíduo encontrado dentro do domínio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Campo Mourão e do fragmento pertencente ao lote 7H localizado às margens da PR 317. A coleta foi realizada em agosto de 2020 sendo que na UTFPR-CM foram coletadas amostras dos 4 indivíduos existentes (Figura 3-B), e no Lote 7H de 20 indivíduos a partir do critério de amostragem por conveniência (Figura 3-C), ou seja, conforme os indivíduos encontrados fossem convenientes para a coleta, excluindo-se indivíduos jovens muito próximos. Neste remanescente, observou-se uma população grande reunida com cerca de mais de 100 indivíduos reunidos.

Figura 3 – Distância e Localização das áreas amostrais dos 24 indivíduos de *Butia paraguayensis* (Barb.Rodr.) Bailey. A – Distância entre os pontos amostrais; B - Universidade Tecnológica Federal do Paraná; C - Lote 7H.



Fonte: Google Earth® (2022).

A partir dessa coleta, o material foi identificado e armazenado com o registro de suas coordenadas geográficas (GARMIN® Etrex 10), sendo encaminhado posteriormente para o processamento laboratorial na Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

5.3 Extração e purificação

Para a extração e purificação do material genômico de interesse, utilizou-se o kit Invitrogen Pure Link® plant total DNA purification.

Seguindo os devidos protocolos, o material foliar foi macerado previamente em almofariz de porcelana juntamente com nitrogênio líquido, sendo posteriormente transferido para tubo eppendorf com 250 µl de buffer (R2), 15 µl de SDS 20% e 15 µl de RNase (20 mg/ml). O material então foi incubado a 55 °C durante 15 minutos em thermo-shaker e centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante resultante foi transferido em tubo estéril com acréscimo de 100 µl de N₂, onde foi misturado no vórtex e resfriado por 5 minutos em freezer, repetindo-se em seguida a centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos.

Após a extração, transferiu-se 250 µl do material para tubo-spin com acréscimo de 375 µl do reagente B4 (diluído em etanol), sendo centrifugado por 30 segundos à 10000 rpm, eliminando-se o escoamento da alíquota. O processo da lavagem foi repetido uma vez com 500 µl de buffer W4 e duas vezes com 500 µl de buffer W5 à 10000 rpm por 30 segundos, sempre com a eliminação do escoamento.

Em sequência, todos os materiais seguiram para a centrifugação a 15000 rpm por 2 minutos, transferindo o spin em novo tubo de coleta estéril, sendo eluído com 100 µl de buffer E1 onde permaneceu em repouso sob temperatura ambiente por 1 minuto, para então ser novamente centrifugado por 15000 rpm por mais 1 minuto. O processo de eluição foi repetido para a obtenção final do DNA, e conseqüentemente armazenado sob refrigeração a -20 °C para o próximo tratamento.

5.4 Reação em cadeia de Polimerase e Eletroforese

Para a reação em cadeia de polimerase (PCR), foram selecionados primers distintos individualmente, a partir da realização de testes de gradientes, com seleção

conforme maior qualidade de amplificação e adequação da temperatura de anelamento da espécie. Para tanto, foi utilizado um volume final de 25 µl, contendo em sua composição 3 µl de primer, 2,5 µl Buffer 10x, 2,5 µl dNTP 2,5 mM, 0,75 µl MgCl 50 mM, 0,2 µl de Taq. Polimerase e 15,05 µl de água ultrapura em cada tubo. Cada amostra então foi inserida no termociclador configurado em etapas de tempo e temperaturas distintas, definidas a partir do teste de gradiente prévio.

As reações foram realizadas seguindo o padrão no termociclador de 94 °C para a desnaturação inicial por 1 minuto e 30 segundos. Entrando nos 40 ciclos, as amostras foram aquecidas a 94 °C novamente por 45 segundos, e adequadas as temperaturas dos gradientes/temperatura selecionadas para cada primer por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, tendo sua extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Após a finalização desse procedimento, o material identificado foi refrigerado para a conseguinte leitura realizada a partir da eletroforese em gel de agarose.

O processo de eletroforese foi executado inicialmente com a produção do gel, por meio da dissolução de agarose em buffer Tris/Borate/EDTA (TBE 1x), onde a quantidade foi proporcional ao tamanho da cuba utilizada. Como houve variação na utilização das cubas, foram necessárias quantidades distintas da solução para que a espessura do gel atingisse aproximadamente 8mm variando entre 1 g e 1,5 g de agarose e 100ml – 150ml de TBE 1x. Esta solução foi aquecida até sua homogeneização e resfriada à 55 °C sendo posteriormente despejada na cuba com os pentes respectivos (1.5 mm de espessura) até a solidificação.

O gel foi submerso em TBE 1x na cuba com relação de corante/DNA de 2 µl/3 µl. O ladder utilizado (KASVI® 100 bp RTU), assim como os parâmetros de voltagem e tempo de corrida foram definidos ao decorrer das análises conforme a verificação de adequação, sendo a configuração mais adequada encontrada na pesquisa para as amostras realizada sob os parâmetros 110 V, 120 W, 400 mA por 50 minutos.

A leitura dos fragmentos amplificados com o corante KASVI® Safer Dye 6x foi realizada a partir de luz ultravioleta em foto documentador L-PIX molecular imaging da Loccus® Biotecnologia.

Após a obtenção de dados suficientes, eles foram submetidos às análises posteriores para a relação de variabilidade genética da espécie.

5.5 Análise de dados

Para a análise dos dados amplificados, utilizou-se o software Gel-Pro Analyzer 4.0.1 na configuração *default* para o dimensionamento das bandas e associação aos devidos pesos moleculares. Tais dados foram a base para a geração da matriz binária de distância genética por meio de sua presença (1) e ausência (0) utilizada no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard a partir do software NTSYSpc (ROHLF, 1992). A matriz gerada permitiu a elaboração do dendrograma de similaridade através do agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average). A escolha do coeficiente de Jaccard para a pesquisa teve como parâmetro a alta capacidade de distinção entre acessos em estudos genéticos quando comparado a outros índices de similaridade (TOMAZ et al., 2020).

Foram estimadas o número de bandas polimórficas, levando em consideração o padrão das bandas de cada primer para cada loco. O número total de bandas polimórficas então foi dividido pelo número de bandas totais para obtenção da taxa de polimorfismo. Os demais parâmetros de diversidade como número de alelos observados (N_a), número de alelos efetivos (N_e), índice de Diversidade Genética de Nei (H) e índice de Shannon (I) foram simuladas no software PopGene32 (YEH; BOYLE, 1999), pressupondo que as frequências alélicas dos indivíduos de Butiá se encontravam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, visto que os marcadores dominantes não possibilitam a diferenciação de indivíduos heterozigotos.

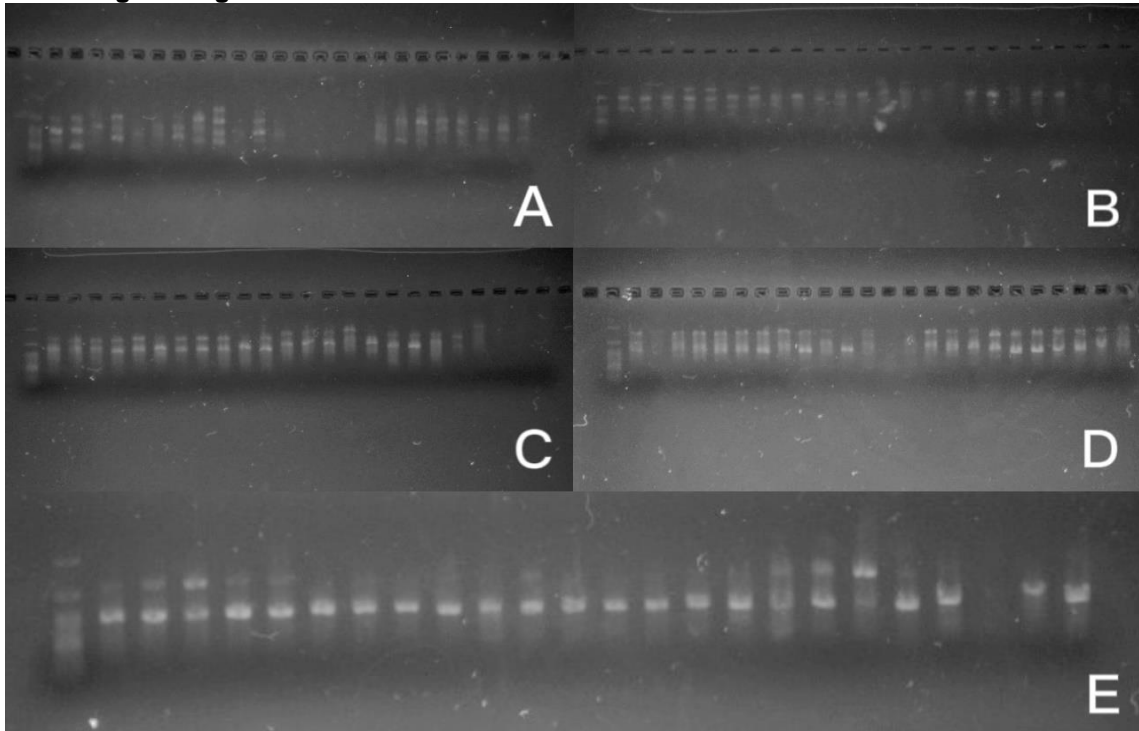
Para a correlação da matriz de distância genética e a matriz de distância geográfica (obtida a partir da classificação estimada das coordenadas geográficas processadas no Google Earth®) utilizou-se o software GenAlex (PEAKALL; SMOUSE, 2012) na elaboração do teste de Mantel para correlação.

O cálculo do potencial discriminatório dos primers foi realizado de acordo com o cálculo do conteúdo informativo polimórfico (PIC) de cada loco com auxílio do programa Genes (Cruz, 2000), que, apesar da caracterização inicial de Botstein et al. (1980), onde valores superiores a 0,5 demonstram caráter de informatividade alta para a diferenciação dos indivíduos perante aquele marcador molecular, enquanto valores entre 0,25 e 0,5 demonstram caráter médio informativo e valores inferiores a 0,25 são considerados pouco informativos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os oito marcadores moleculares de sequências de nucleotídeos conhecidos utilizados, cinco deles (ISSR 4, ISSR 7, ISSR 8, ISSR 10 e ISSR 14) apresentaram um padrão adequado para a caracterização molecular dos indivíduos. Os cinco iniciadores geraram um total de 193 bandas, com média de 38 bandas por primer com intervalos de amplitude entre 500 e 3000 pares de base (Figura 4). Os outros três iniciadores (ISSR 6, ISSR 11, ISSR 13) foram descartados da pesquisa devido a produção insuficiente/ineficiente de bandas.

Figura 4 – Padrão de amplificação dos indivíduos de *Butia paraguayensis* (Barb.Rodr.) Bailey em gel de agarose. A – ISSR 4. B – ISSR 7. C – ISSR 8. D – ISSR 10. E – ISSR 14.



Fonte: Aatoria Própria (2022)

Como disposto anteriormente cada primer foi submetido a gradientes iniciais para adequação da temperatura de anelamento ideal, cuja variação ocorreu entre temperaturas de 46 °C a 54,8 °C, valores próximos aos utilizados por Gaiero et al. (2011), cuja temperatura variou entre 48 °C e 50 °C para indivíduos de diferentes espécies de *Butia* spp.

Os valores de PIC, associados ao número de alelos e sua frequência para cada primer variaram de 0,14 (ISSR 14) a 0,21 (ISSR 8), com média de 0,18 demonstrando caráter pouco informativo dos marcadores para polimorfismos existentes. Tal valor

médio também foi encontrado no estudo de Carneiro (2013) com a utilização consonante de marcadores dominantes ISSR, porém para o estudo do germoplasma de acessos de inhame, chegando a valores de PIC (0,11 - 0,28) próximos aos dos marcadores utilizados neste estudo para os acessos de Butiá.

Tabela 1 - Relação dos cinco primers ISSR utilizados para a análise da estrutura genética de *Butia paraguayensis* (Barb. Rodr.) Bailey coletadas em Campo Mourão, Paraná. TA – Temperatura de anelamento. NBTA – Número de Bandas Totais Amplificadas. NBP – Número de Bandas Polimórficas. PIC – Índice de Conteúdo Polimórfico.

PRIMER	Sequencia (5' a 3')	TA	NBTA	NBP	Taxa de Polimorfismo (%)	PIC
ISSR 4	ACA CAC ACA CAC ACR G	46,4 °C	43	28	65%	0,171
ISSR 7	CAC CAC CAC CAC RC	54 °C	38	29	76%	0,1848
ISSR 8	CAC ACA CAC ACA CAC AG	54,6°C	39	9	23%	0,2113
ISSR 10	CTC TCT CTC TCT CTC TT	46 °C	43	17	57%	0,1986
ISSR 14	GTG GTG GTG GTG GTG	54,8°C	30	17	40%	0,1413

Fonte: Autoria própria (2022).

Segundo Nei (1973), a variabilidade genética pode ser mensurada por meio da frequência alélica dos indivíduos, seu nível de heterozigidade (aproximando-se de 50% para diversas espécies estudadas), assim como a taxa de polimorfismo dos loci, que pode variar de 10 a 90% (SOUZA; CORDEIRO; DE TONI, 2011).

De acordo com a Tabela 1, a média do número de alelos observados (N_a) para os 24 indivíduos de *B. paraguayensis* foi de 1,55, enquanto o número de alelos efetivos chegou a um valor de 1,25, o que corresponde ao estudo de Chagas et al. (2015) envolvendo marcadores dominantes em indivíduos de outra espécie da família Araceae, ao analisar 13 acessos de *Elaeis guineensis* Jacq. (Dendê), obtendo valores de $N_a = 1,5$ e $N_e = 1,338$.

Para os índices de diversidade de Nei (H') e Shannon (I), o valor médio foi de 0,15 e 0,23 respectivamente, sendo considerado valores baixos e, portanto, indicando um baixo nível de diversidade genética, já que na literatura para o índice de Shannon denota-se uma variância nos valores de 0 a 1, sendo 1 o auge da diversidade gênica de uma população (LEWONTIN, 1972).

Dos 24 indivíduos analisados, para o primer ISSR 4, 18 anelaram, com taxa de polimorfismo de 65%. Para o primer ISSR 7, 19 anelaram sob uma taxa de polimorfismo de 76%. Enquanto para os primers ISSR 8, ISSR 9 e ISSR 10, se anelaram respectivamente 21 indivíduos a uma taxa de 23%, 21 indivíduos a 57% e

22 indivíduos a 40%. O que nos leva a uma taxa de 52% de polimorfismo dos 24 indivíduos analisados já que das 193 bandas totais, 100 demonstraram caráter polimórfico, dispondo assim, um valor considerado baixo para porcentagem de polimorfismo, o que indica um baixo fluxo gênico entre os indivíduos.

As similaridades genéticas detectadas para os 24 acessos de *B. paraguayensis* de acordo com o coeficiente de Jaccard variaram de 0,0714 a 0,9167, não havendo indivíduos idênticos de acordo com os parâmetros analisados e demonstrando uma considerável discriminação nos agrupamentos. A maior distância genética observada de acordo com o dendrograma gerado pelo método UPGMA (Figura 5) foi entre os indivíduos 7H18 e 7H20 e a menor distância foi entre os acessos U4 e 7H4.

O dendrograma foi dividido em três agrupamentos para melhor visualização. No agrupamento um, verifica-se a presença de indivíduos com os maiores valores de similaridade e amplitude de similaridade de aproximadamente 0,4 a 0,9, abrangendo sítios que mostram uma relação similar entre as populações do Lote 7H e dos indivíduos da UTFPR e demonstrando também que a maior similaridade encontrada (U4 e 7H4) foi entre indivíduos coletados nesses dois pontos amostrais, indicando para os indivíduos resgatados a possibilidade de germoplasma de origem do Lote 7H.

Fato que se constatou posteriormente pois os indivíduos localizados na UTFPR foram resgatados de locais próximos ao remanescente amostrado e pois o indivíduo U4 tratou-se de um acesso cuja semente era oriunda do Lote 7H e que germinou a partir de um dos testes de quebra de dormência por meio de fogo, sendo plantada no domínio da Universidade posteriormente (informação verbal)¹.

Notou-se também a geração de um subgrupo menor (7H9 e 7H10) com aproximadamente 0.3 de similaridade aos demais 17 indivíduos.

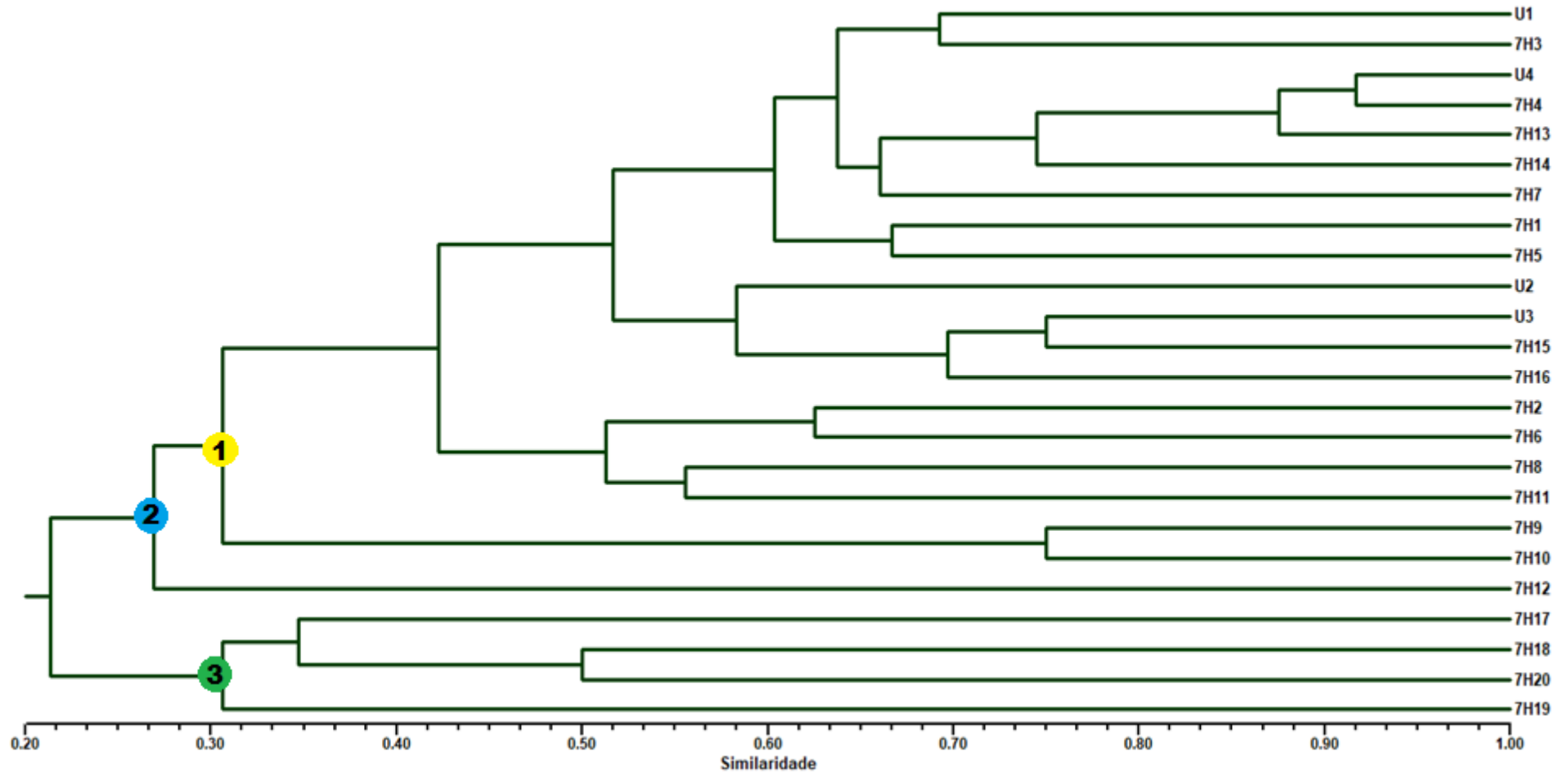
No agrupamento dois, verifica-se a existência de um indivíduo isolado caracterizado como 7H12, com menos de 0,3 de similaridade do grande grupo de indivíduos do agrupamento 1.

No terceiro e último agrupamento verifica-se a existência de um grupo isolado dos demais, com valor de similaridade inferior a 0,25 e composto por 4 indivíduos do Lote 7H.

¹ Comunicação verbal com prof. Dr. Marcelo Galeazzi Caxambu, curador do Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em 30 dez. 2022.

Com este panorama é possível visualizar que a maior distinção genética ocorreu sobretudo em indivíduos dentro da própria população, localizados mais próximos entre si e não entre as populações, com os indivíduos mais distantes, fato que corrobora com os resultados obtidos pela correlação do teste de Mantel e com outros estudos a nível molecular com espécies de *Butia* spp., como Gaiero et al. (2011), onde verificou-se valores de variabilidade dentro das populações maiores que entre as populações, resultado também observado por Magalhães (2014).

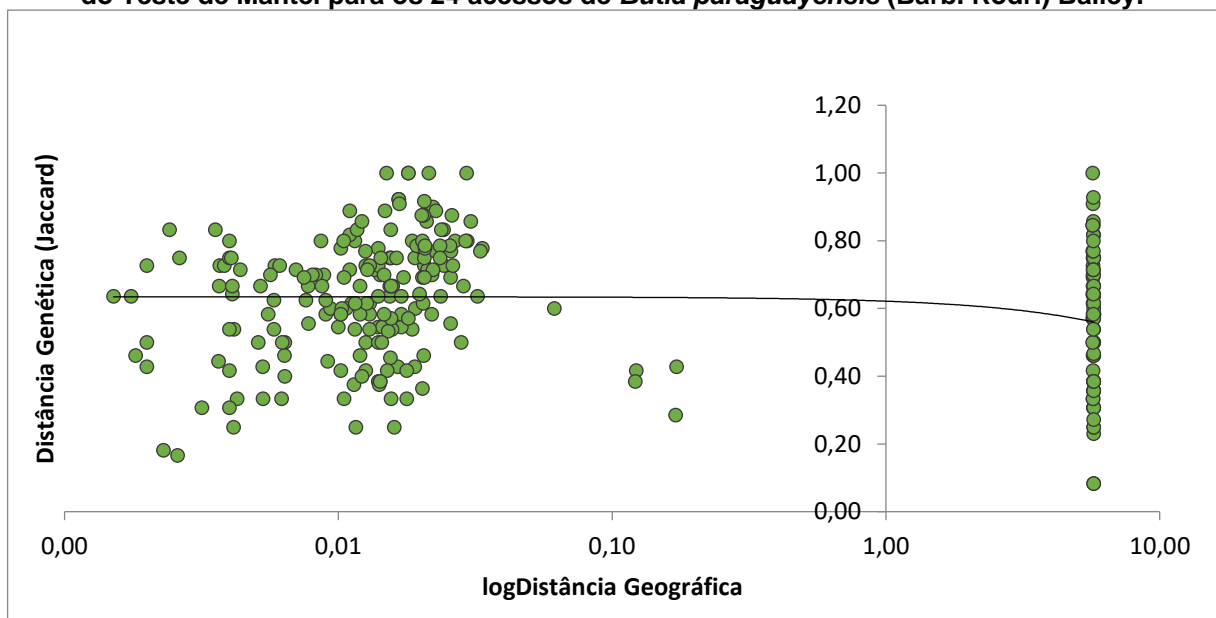
Figura 5 – Dendrograma de similaridade de acordo com coeficiente de Jaccard para os 24 acessos de *Butia paraguayensis* (Barb. Rodr.) Bailey do município de Campo Mourão, Paraná.



Fonte: Autoria Própria (2022)

O teste de Mantel (Figura 6) realizado entre os 24 acessos, resultaram em um coeficiente não significativo para as relações de distâncias geográfica e genética ($r = 0,033$). Portanto, isso caracteriza que a influência da distância geográfica sobre a distância genética é mínima (3%) entre os indivíduos de Butiás para tais marcadores ISSR. Tal resultado diverge com o encontrado na literatura para outras espécies de Butiá, denotando valores de coeficiente consideravelmente significativos para o estudo de Gaiero et al. (2011), onde $r = 0,652$ e para Magalhães (2014) onde o valor de $r = 0,472$, mostrando que para os respectivos estudos a distância genética possui influência da distância geográfica.

Figura 6 – Gráfico de correlação entre distância genética (y) e distância geográfica (x) a partir do Teste de Mantel para os 24 acessos de *Butia paraguayensis* (Barb. Rodr.) Bailey.



Fonte: Autoria Própria (2022).

Dados com capacidade de assimilar e distinguir geneticamente espécies auxiliam no banco de informações perante a diversidade genética e a relação filogenética, ao caracterizar parte de uma informação de determinado indivíduo.

Neste estudo, verificou-se, sobretudo, uma baixa variabilidade genética quando se analisou os acessos sob os índices de diversidades utilizados, sugerindo um baixo fluxo gênico entre esses indivíduos no município, denotando a necessidade de estratégias de conservação que auxiliem nos processos de fluxo gênico entre os indivíduos que restam nos enclaves de Cerrado existentes do município.

As alterações no habitat perante a descontinuidades da paisagem fragmentam populações dificultando o fluxo gênico entre elas, podendo estar diretamente relacionada à redução da dispersão eficiente, deixando essa população isolada e suscetível a processos endogâmicos e de deriva genética com a fixação de alelos e afetando diretamente na diminuição da variabilidade gênica de uma espécie. Contudo, deve-se levar em consideração que as características genéticas de uma população necessitam de um panorama espaço temporal, para uma análise histórica que ajude na compreensão e manejo adequado (GUEDES, 2004).

Portanto, é pertinente que haja mais estudos para comparações interpopulacionais de Butiás dentro e fora do município para estabelecer um panorama maior da ligação genética entre a espécie e para fomentar o banco de informações moleculares para a espécie ameaçada, e assim auxiliar no embasamento de estratégias que visem a conservação desses indivíduos.

7 CONCLUSÃO

A partir desse estudo foram coletados um total de 24 indivíduos de *Butia paraguayensis* (Arecaceae) na região urbana de Campo Mourão e selecionados cinco marcadores ISSR com bom padrão de amplificação, onde, apesar do baixo índice de diferenciação do conteúdo polimórfico (PIC) para os primers nesta espécie, verificou-se que para os acessos genéticos amostrados houve um baixo índice de polimorfismo e heterozigosidade, indicativos de baixa variabilidade genética e fluxo gênico e cuja correlação genética e geográfica demonstrou que a distância genética dos Butiás para os marcadores dominantes em questão não sofre interferência significativa da distância geográfica, o que pôde ser visualizado a partir do dendrograma de similaridade. O que denota, portanto, a necessidade de estudos complementares que fomentem a geração de informações moleculares para as populações existentes da espécie ameaçada, auxiliando num panorama espaço temporal que auxilie nos planos de manejo e conservação de *B. paraguayensis* no Cerrado da cidade de Campo Mourão.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E. F.; CASALI, D.; COSTA-ARAÚJO, R.; GARBNINO, G. S. T.; LIBARDI, G. S.; LORETTO, D.; LOSS, A. C.; MARMONTEL, M.; MORAS, L. M.; NASCIMENTO, M. C.; OLIVEIRA, M. L.; PAVAN, S. E.; TIRELLI, F. P. Lista de Mamíferos do Brasil (2021-2). **Zenodo**, 2021. Disponível em: <https://zenodo.org/record/5802047#.Y4ooJ8vMLDf>. Acesso em: 30 dez. 2022. DOI: 10.5281/zenodo.5590556
- ADHIKARI, S.; SAHA, S.; BISWAS, A.; RANA, T. S.; BANDYOPADHYAY, T. K.; GHOSH, P. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. **The Nucleus**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 283-297, 2017.
- AMAMOS Butiá. Direção: Gustavo Crizel Gomes. Rio Grande do Sul: Embrapa Clima Temperado; Flora pelotensis; Universidade Federal de Pelotas; CEAMA, 2005. Disponível em: <http://youtu.be/pwq7DnX6dql>. Acesso em: 2 set. 2020.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.
- BÜTTOW, M. V.; BARBIERI, R. L.; NEITZKE, R. S.; HEIDEN, G. Conhecimento tradicional associado ao uso de butiás (*Butia* spp., Arecaceae) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. [online], v. 31, n. 4, p. 1069-1075, 2009.
- CALLENBACH, E. **Ecologia: um guia de bolso**. Petrópolis: Fundação Peirópolis, 2001. 220 p.
- CARNEIRO, J. L. dos S. **Caracterização morfológica e molecular de germoplasma de Inhame**. 2013. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2013.
- CAVIGLIONE, J. H.; KIIHL, L. R. B.; CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, D.; GALDINO, J.; BORROZINO, E.; GIACOMINI, C. C.; SONOMURA, M. G. Y.; PUGSLEY, L. Cartas Climáticas do Estado do Paraná. **InfoAgro 2000**. Ponta Grossa, p. 1-6, out. 2000. Trabalho apresentado no Congresso e Mostra de Agroinformática, 2000, Ponta Grossa, PR.
- CAXAMBU, M. G.; GERALDINO, H. C. L.; DETTKE, G. A.; SILVA, A. R.; SANTOS, E. N. Palmeiras (Arecaceae) nativas no município de Campo Mourão, Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p. 259-270, 2015.
- CHAGAS, K. P. T.; SOUSA, R. F.; FAJARDO, C. G. VIEIRA, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineenses*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v. 10, n. 1, 2015.
- COSTA, A. M. A. Genética da conservação. In: MARTINS, M. B.; JARDIM, M. A. G.; **Reflexões em Biologia da Conservação**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2018. p. 106 – 115.

CRUZ-CRUZ, C. A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. *Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity*. **Resources**, [s.l.], p. 73-95, 2013.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **Programa GQMOL: genética quantitativa e molecular**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>. Acesso em 20 out. 2022.

DEBLE, L. P.; MARCHIORI, J. N. C.; ALVES, F. S.; OLIVEIRA-DEBLE, A. S. Survey on *Butia* (Arecaceae): from Rio Grande do Sul State (Brazil). **Balduinia**, Vol. 30, p. 3-24, 2011.

FERREIRA, I. J. M.; BRAGION, G. R.; FERREIRA, J. H. D.; BENEDITO, E.; COUTO, E. V. Landscape pattern changes over 25 years across a hotspot zone in southern Brazil. **Southern Forests**, v. 81, p. 1-10, 2019.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280 p.

GAIERO, P.; MAZELLA, C.; AGOSTINI, G.; BERTOLAZZI, S.; ROSSATO, M. Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Butia* Becc. species based on ISSR. **Plant Systematics and Evolution**, v. 292, p. 105-116. 2011.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**. [s.l.], v. 19, n. 3, p. 632-639, 2005.

GUEDES, F. B. **Genética da conservação como uma ferramenta para avaliar os problemas populacionais da fragmentação de habitat**. 2004. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2004.

HATSCHBACH, G.G.; ZILLER, S.R. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no estado do Paraná**. Curitiba: SEMA/GTZ, 139 p, 1995.

HEIDEN, G., ELLERT-PEREIRA, P.E., ESLABÃO, M.P. *Butia* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB26576>. Acesso em: 11 ago. 2020.

INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Caderno Estatístico**: Município de Campo Mourão. Curitiba, 2020. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/cadernos/MontaCadPdf1.php?Municipio=87300>. Acesso em 10 set. 2020.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

LAVERTY, M.F.; GIBBS, J.P. Ecosystem Loss and Fragmentation. *Synthesis.*, **Lessons in Conservation**, v.1, p. 72-96, 2007.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**. v. 6, p.381-398. 1972.

LIBERALI, L.. **Os enclaves de vegetação semiúmida e semiárida nas áreas peculiares dos Municípios de Campo Mourão, Luiziana e Tuneiras do Oeste – Paraná**. 2014. 97 f. Tese (Doutorado em Geografia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F. FERREIRA, E. **Flora Brasileira - Arecaceae (Palmeiras)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010. 384 p.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. 3ª edição. Curitiba: Imprensa Oficial, 2002. 440 p.

MACHADO, R.B.; RAMOS NETO, M.B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Brasília: Conservação Internacional, 2004.

MAGALHÃES, H. M. **Diversidade Genética, caracterização nutricional e conteúdo de DNA de diferentes tecidos de *Butia capitata***. 2013. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2013.

MALAJOVICH, M. A. **BIOTECNOLOGIA 2011**. 1. ed. rev. Rio de Janeiro: Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2011. 302 p. v. 1. ISBN: 85-7323-223-4.

MEIRA NETO, J. A. A.; SAPORETTI JÚNIOR, A. W. Parâmetros fitossociológicos de um cerrado no Parque Nacional da Serra do Cipó, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 5, p. 645-648, 2002.

MARICÁ, M. **Máximas, Pensamentos e Reflexões**. Editora Leão de Ouro. 1967. 568p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2002. 404 p.

MITTERMEIER, R.A.; TURNER, W.R.; LARSEN, F.W.; BROOKS, T.M.; GASCON, C. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. *In*: ZACHOS, F.E.; HABEL, J.C. **Biodiversity hotspots: Distribution and Protection of Conservation Priority Areas**. Berlin: Springer, 2011. p. 3-22.

MONTEIRO, M.R.; PAROLIN, M.; CAXAMBU, M. G. Análise da assembléia fitolítica em solo superficial e serrapilheira em dois fragmentos de cerrado em área urbana de Campo Mourão – Paraná. **Revista Brasileira de Geografia Física**, Recife, v. 08, n. 04, p. 1256-1272, 2015.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 70, n. 12, p. 3321-3323. 1973.

NEVES, A. G. S.; CHAGAS, K. P. T.; SALES, R. P.; COSTA, M. P.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de iniciadores moleculares ISSR para estudos de variabilidade genética da *Syagrus cearensis* Noblick. **Agropecuária Científica no Semiárido**. Paraíba, v.15, n.3, p.228-231, 2019.

NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? **American Society for Microbiology Science**, [s.l.], v. 9, n.1, p. 30-39, 2015.

NOSS, REED. **ANNOUNCING THE WORLD'S 36TH BIODIVERSITY HOTSPOT: THE NORTH AMERICAN COASTAL PLAIN**. 18 fev. 2016. Disponível em: <https://www.cepf.net/stories/announcing-worlds-36th-biodiversity-hotspot-north-american-coastal-plain#.WA5qeZMrJE4>. Acesso em: 1 ago. 2022.

ODALIA-RÍMOLI, A.; ARRUDA, J.; RÍMOLI, J.; BUENO, N. R.; COSTA, R. B. Biodiversidade, Biotecnologia e Conservação Genética em Desenvolvimento Local. **Interações: Revista Internacional de Desenvolvimento Local, Campo Grande**, v. 1, n. 1, p. 21 – 30, 2000.

PALEARI, L. M. **Frutas e seus frugívoros**. 01. ed. Botucatu: FEPAF, 2012. v. 01. 173p.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**. 2012.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: CULLEN, L. J.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C.; (Org.) **Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre**. Curitiba: Editora UFPR, 2003. p. 343 – 380.

RIO GRANDE DO SUL. **Decreto nº 42.099, de 31 de dezembro de 2002**. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. Porto Alegre: Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul. p. 1-6, 2003.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc - **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 1.70. New York: Exeter Software, 1992. 217 p.

RIVAS, M.; BARBIERI, R. L. **Boas práticas de manejo para extrativismo sustentável do butiá**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2014. 59 p.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. Mapeamento de cobertura vegetal do Bioma Cerrado. In: **Embrapa Cerrados - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. 60p. DF, 2008.

SANO, E.E.; ROSA, R.; SCARAMUZZA, C.A. M.; ADAMI, M.; BOLFE, E.L.; COUTINHO, A.C.; ESQUERDO, J.C.D.M.; MAURANO, L.E.P.; NARVAES, I. da S.; OLIVEIRA FILHO, F.J.B. de; SILVA, E.B. da; VICTORIA, D. de C.; FERREIRA, L.G.;

BRITO, J.L.S.; BAYMA, A.P.; OLIVEIRA, G.H. de; BAYMA-SILVA, G. Land use dynamics in the Brazilian Cerrado in the period from 2002 to 2013. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.54, 2019.

SANTOS, J. F.; MARIGUELE, K. H.; PEREIRA, A.; ZAMBONIM, F. M.; VENTURIERI, G. A. Variabilidade genética entre e dentro de grupos de *Euterpe* spp. com base em microssatélites. **Revista de la Facultad de Agronomía**. La Plata. v. 119, p. 1-7, 2020.

SANTOS, S. K. S.; ORTEGA, J. R.; ROCHA, G. P.; MELO, A. F.; OLIVEIRA, D. A.; BRANDÃO, M. M.; ROYO, V. A.; MENEZES, E. V. Transferibilidade de marcadores SSR, diversidade e estrutura genética em *Syagrus oleracea*. **Brazilian Journal of Development**. Curitiba, v. 6, n. 8, p. 59931-59947, 2020.

SCHLAEPFER, D. R.; BRASCHLER, B.; RUSTERHOLZ, H.-P.; BAUR, B. Genetic effects of anthropogenic habitat fragmentation on remnant animal and plant populations: a meta-analysis. **Ecosphere**, v. 9(10), p. 1-17, 2018.

SOARES, K. P., LONGHI, S. J., WITECK NETO, L., ASSIS, L. C. Palms (Arecaceae) from Rio Grande do Sul, Brazil. **Rodriguésia**, v. 65, p. 113–139, 2014.

SOUZA, I. R.; CORDEIRO, J.; DE TONI, D. C. **Genética Evolutiva**. 1 ed. Florianópolis: UFSC, 2011. v. 1. 231p.

THE PLANT LIST. **Arecaceae**. Version 1.1. [S.l.], 2013. A working list of all plant species by the collaboration between the Royal Botanic Gardens, Kew and Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Arecaceae/>. Acesso em: 2 set. 2020.

TOMADON, L. S.; DETTKE, G. A.; CAXAMBU, M. G.; FERREIRA, I. J. M.; COUTO, E. V. Significance of forest fragments for conservation of endangered vascular plant species in southern Brazil hotspots. **Écoscience**, v.26, p. 221-235, 2019.

TOMAZ, F. L. S.; SILVA, A. P. M.; ARAUJO, L. B. R.; CUNHA NETO, J.; BERTINI, C. H. C. M. Coeficientes de similaridade para avaliação da diversidade genética em pinhão-mansão por marcadores ISSR. **Nativa**, Sinop, v. 8, n. 4, p. 456-463, jul./ago. 2020.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. **DNA fingerprinting in plants: Principles, Methods, and Applications**. 2. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2005. 472 p.

YEH, F.C.; BOYLE, T.B.J. 1997. **POPGENE Microsoft Windows-based software for populations genetic analysis**. University of Alberta and Center for international Forestry Research. 1999.