

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO – OESTE
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

BRUNA SAVIATTO FAGUNDES

**ESTRUTURA GENÉTICO-POPULACIONAL DE *Eugenia uniflora* L.
(MYRTACEAE) EM FRAGMENTOS FLORESTAIS DE MATA ATLÂNTICA**

GUARAPUAVA

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO – OESTE
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

BRUNA SAVIATTO FAGUNDES

**ESTRUTURA GENÉTICO-POPULACIONAL DE *Eugenia uniflora* L.
(MYRTACEAE) EM FRAGMENTOS FLORESTAIS DE MATA ATLÂNTICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós – Graduação em Biologia Evolutiva na Universidade Estadual do Centro – Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

ORIENTADOR: DR. PAULO ROBERTO DA SILVA

GUARAPUAVA

2013

Orientador

Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva

Co – orientador

Prof. Dr. Marcos Ventura Faria

Dedico esse trabalho àqueles que me inspiram dedicação, coragem e determinação: minha mãe Arlete Maria Saviatto e meu orientador Dr. Paulo Roberto Da Silva.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me iluminar e colocar no meu caminho as pessoas que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho;

Aos meus pais, minha irmã e minha afilhada pelo amor, compreensão, carinho e fé;

Aos meus amigos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, Letícia, Renata, Lucas, Wagner, Daiane, Nayara, Rafael, Cláudia, Laura, Ricardo e Alex por me darem a oportunidade de aprender a ensinar e agradeço aos momentos de descontração, aos sorrisos e às lágrimas e principalmente sou grata pelo companheirismo e auxílio de todos;

À minha amiga Renata que foi e será muito importante para a concretização de tantos sonhos e pela amizade diária;

À Cláudia por estar ao meu lado nas etapas mais importantes deste trabalho e pela compreensão, respeito e amizade;

Aos meus queridos Wagner (Dindo), Cris por compreenderem a minha ausência e por todo carinho e incentivo;

Ao Durinézio J. Almeida por me auxiliar coletas do material vegetal;

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva e Departamento de Ciências Biológicas pelo incentivo, respeito e amizade;

Ao professor Marcos Ventura Faria (Marcão) pela amizade, pelo importante auxílio nas análises desse projeto e também agradeço pelas palavras de coragem e ânimo na fase final do meu mestrado;

Ao professor Rogério pelos conselhos e direcionamentos na discussão dos resultados do meu projeto, muito obrigada!

E por fim, ao meu querido amigo orientador Paulo Roberto por me incentivar a ingressar nesse programa de mestrado, pela oportunidade de crescer profissionalmente ao seu lado e por acreditar em mim. Agradeço-te por todos os ensinamentos e principalmente por me ensinar a buscar os meus sonhos pelos caminhos mais difíceis pois é na dificuldade que as maiores vitórias são conquistadas, afinal, “no fim tudo dá certo, se ainda não deu, é porque não chegou ao fim”!

Este é apenas o começo do que está por vir e deixo registrado aqui a minha gratidão a todos vocês que me auxiliaram de algum modo,

Obrigada!

“Tudo o que já foi é o começo do que vai vir.”

(Guimarães Rosa)

RESUMO

Estrutura genético-populacional de *Eugenia uniflora* L. em fragmentos florestais de Mata Atlântica.

Bruna Saviatto Fagundes

A redução de habitats naturais contribui para a perda de biodiversidade e para o isolamento das populações remanescentes. Uma espécie vegetal com grande representatividade na Mata Atlântica é a *Eugenia uniflora* L., também conhecida como pitangueira. Objetivando investigar os efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações naturais de *Eugenia uniflora*, sete *loci* ISSR e nove *loci* SSR foram amplificados em três populações de fragmentos de Floresta Ombrófila Mista. O coeficiente médio de similaridade entre as populações A, C e D foi de 0,31. A similaridade genética entre os indivíduos da população mais isolada (0,42) foi maior que a similaridade encontrada entre os indivíduos das populações C (0,34) e D (0,36) que, por sua vez, estão conectadas. O agrupamento de todos os indivíduos formou três grupos correspondentes a cada população estudada. Uma alta diferenciação genética foi observada entre as três populações ($F_{ST} = 0,34$; $I = 0,51$), sendo que dentro das populações a diferenciação foi maior do que entre as populações, correspondendo a 71,33% e 28,67% respectivamente. A média da diversidade genética dentro das populações ($H_o = 0,33$; $H_e = 0,47$) indica uma deficiência de heterozigotos pelo aumento dos cruzamentos endogâmicos ($F_i = 0,29$) e constitui uma resposta à redução do fluxo gênico ($N_m = 0,48$). De acordo com o agrupamento da distância genética de Nei (1978), a população A e D foram as mais distantes geneticamente. A redução da variabilidade genética da espécie nessas áreas fragmentadas poderá, futuramente, alterar a capacidade adaptativa de *E. uniflora* às mudanças ambientais e interferir na dinâmica de comunidade de espécies associadas.

Palavras – chave: Fragmentação florestal; Conservação; SSR; ISSR; Pitanga.

ABSTRACT

Population genetic structure of *Eugenia uniflora* L. in forest fragments of Atlantic Forest.

Bruna Saviatto Fagundes

The reduction of natural habitats contributes to the loss of biodiversity and to the isolation of the remaining populations. A plant species that has great representativeness in the Atlantic forest is the *Eugenia uniflora* L., also known as Surinan cherry tree. Intending to investigate the effects of the forest fragmentation in the genetic structure of natural populations of *Eugenia uniflora*, nine *loci* SSR and seven *loci* ISSR were amplified in three Rain Forest fragment populations. The similarity average coefficient between the A, C and D was of 0,31. The genetic similarity among the individuals of the most isolated population (0,42) was bigger than the one found among the populations C (0,34) and D (0,36), which, on the other hand, are connected. The grouping of all the individuals formed three groups corresponding to each studied population. A high genetic diversity was observed among the three populations ($F_{ST} = 0,34$; $I = 0,51$), and the differentiation was bigger inside the population than among them, corresponding to 71,33% and 28,67% respectively. The genetic diversity average inside the populations ($H_o = 0,33$; $H_e = 0,47$) indicates a deficiency of heterozygotes by the increase of endogamous crossing ($F_i = 0,29$) and constitutes an answer to the gene flow reduction ($N_m = 0,48$). According to the grouping of Nei's genetic distance (1978), population A and D were the most genetically distant. The species genetic variability reduction on these fragmented areas may change the *E. uniflora* adaptive capacity to environmental changes and interfere with the community dynamic of associated species.

Keywords: Forest fragmentation; Conservation; SSR, ISSR; Surinan cherry.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Fragmentação da Mata Atlântica no Brasil 14

Figura 2. Fragmentação da Mata Atlântica no Paraná 14

CAPÍTULO 1

Figura 1. Localização das populações de *Eugenia uniflora* 35

Figura 2. Dendrograma baseado na distância genética de Nei (1978)..... 35

Figura 3. Dendrograma de similaridade genética 36

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados nesse estudo 36

Tabela 2. Estimativas de parâmetros genéticos em três populações de *Eugenia uniflora* 36

Tabela 3 *Primers* ISSR e temperatura de anelamento utilizada para cada *primer*..... 37

Tabela 4: Diversidade Genética em *Eugenia uniflora*. 37

Tabela 5. AMOVA 37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Fragmentação florestal e sua implicação nos Biomas	11
1.2 Bioma Mata Atlântica e a Floresta Ombrófila Mista	12
1.3 Marcadores Moleculares	14
1.4 <i>Eugenia uniflora</i> L.	16
1.5 Diversidade genética e fragmentação florestal	18
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS E RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
CAPÍTULO 1	21
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fragmentação florestal e sua implicação nos Biomas

A redução da cobertura florestal em ambientes naturais é resultado do processo de crescimento demográfico e consequente expansão das atividades antrópicas, como agricultura, pecuária, industrialização e ocupação urbana, resultando na alteração de paisagens naturais e consequente fragmentação florestal (Salgueiro *et al.*, 2004). Essas alterações nos padrões espaciais das florestas afetam a qualidade e a biodiversidade do habitat (Gascon e Lovejoy, 1999; Carvalho e Vasconcelos, 1999; Scariot, 1999; Laurance *et al.*, 2000).

A fragmentação florestal consiste na formação de mosaicos a partir de fragmentos de diversos tamanhos de vegetação em áreas agrícolas e urbanas (Collevatti, *et al.*, 2001). Essa redução de habitat contribui para a diminuição da biodiversidade e para o isolamento de populações remanescentes, podendo causar mudanças na história evolutiva das espécies (Bierregaard *et al.* 1992; Young e Boyle, 2000).

Como consequência do isolamento, pode ocorrer diminuição do fluxo gênico entre as populações e aumento da deriva genética, sendo esta última caracterizada pela variação aleatória das frequências gênicas ao longo das gerações e tem como consequência a fixação ou extinção de alelos (Ferreira *et al.*, 2002; Estopa *et al.*, 2007), submetendo a espécie a um possível risco de extinção (Loveless e Hamrick, 1984).

Em ambientes naturais a variabilidade genética se mantém alta graças a frequentes taxas de mutação e fluxo gênico entre indivíduos de uma população a outra (Matioli, 2001). Esta variação encontrada nas populações naturais é a base dos processos evolutivo e deste modo, o conhecimento da variabilidade genética é de grande importância para a compreensão da história evolutiva das espécies (Mateus e Sene, 2003).

Os estudos genéticos que buscam entender a variabilidade genética e a manutenção da biodiversidade de espécies que habitam os fragmentos florestais auxiliam na elaboração de estratégias de manejo e conservação dessas áreas (Kageyama, 1987). A ciência da genética para a conservação tem por objetivo utilizar ferramentas, como os marcadores moleculares, e sua interpretação ecológica e evolutiva para tornar mínimo os danos ocasionados pela ação antrópica nas populações naturais (Allcock *et al.*, 1995).

1.2 Bioma Mata Atlântica e a Floresta Ombrófila Mista

A Mata Atlântica é o mais ameaçado dos biomas florestais brasileiros. Originalmente, a área de ocorrência da vegetação da Mata Atlântica era de 150 milhões de hectares, e destes, 92% era distribuído ao longo das encostas do país (Figura 1). Ao longo do processo de colonização, o bioma foi o mais atingido pela antropização. Atualmente, a área de vegetação nativa atinge apenas 7% da área original (Figura 2). A Mata Atlântica está reduzida a pequenos fragmentos de florestas, os quais, na maioria das regiões, encontram-se isolados por cidades e extensas áreas agrícolas. Dessa forma, os poucos remanescentes que ainda restam do bioma estão limitados a pequenas manchas de vegetação (MMA, 2006).

A Mata Atlântica é constituída por diversos tipos de florestas, incluindo a Floresta Ombrófila Mista (FOM), ou também conhecida como Floresta de Araucária. A delimitação da FOM é definida pela presença do pinheiro – do – Paraná (*Araucaria angustifolia*) (Mähler JR e Larocca, 2009). A FOM abrange os estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais, mas sua maior abrangência é no estado do Paraná e também é onde apresenta o maior índice de devastação (Hueck, 1953; Veloso *et al.*, 1991). Atualmente a FOM é constituída por menos de 0,7% da sua área original (MMA, 2002).

Na região de Guarapuava, Estado do Paraná, são poucos os fragmentos de vegetação nativa existentes e a paisagem em mosaico é isolada por grandes áreas agrícolas (Figura 2) (Mähler JR e Larocca, 2009; Fonseca, 2009). Para assegurar a conservação da biodiversidade que resta na região, é necessário a realização de estudos para compreender a dinâmica das espécies em fragmentos florestais e planejar estratégias de conservação.

Figura 1 –
Fragmentação da
Mata Atlântica no
Brasil. A área em
amarelo representa
a cobertura original
da Mata Atlântica;
a área verde são os
remanescentes da
mata no ano de
2008. Fonte: SOS
Mata Atlântica.

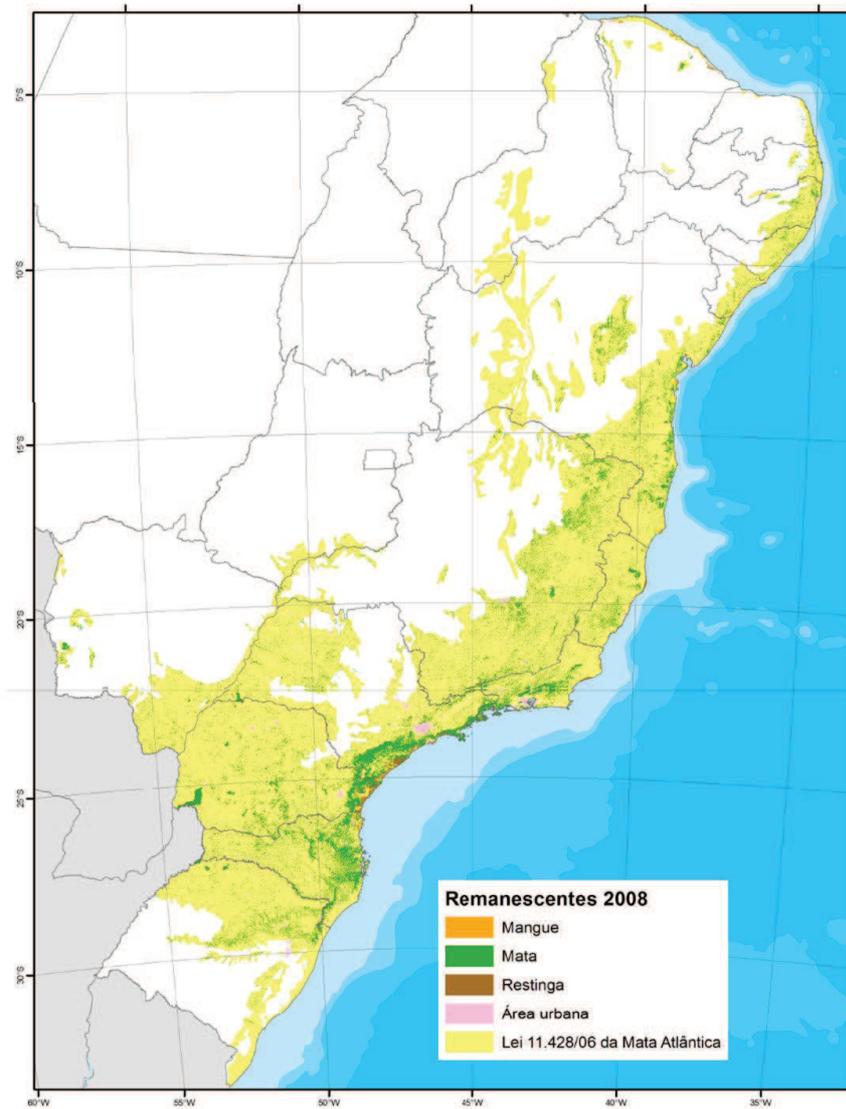
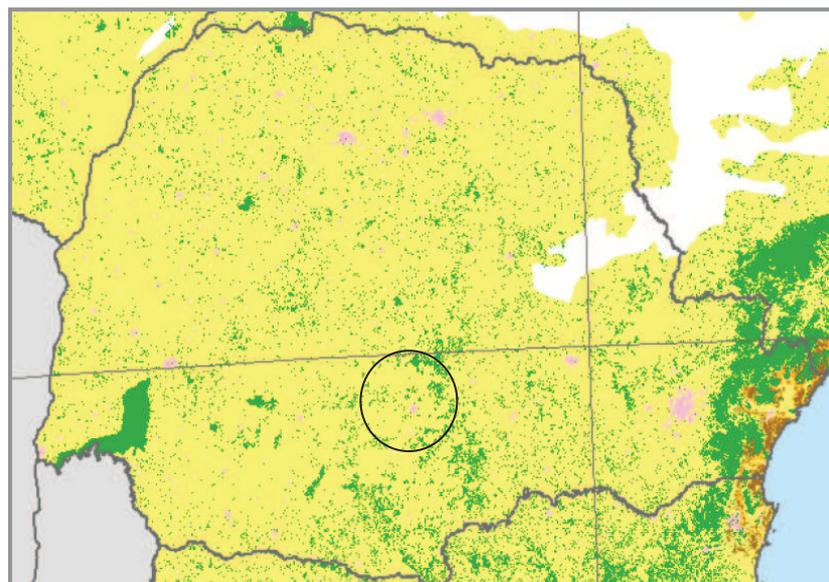


Figura 2 –
Fragmentação da Mata
Atlântica no Paraná. A
área em amarelo
representa a cobertura
original da Mata
Atlântica; a área verde
são os remanescentes
da mata no ano de
2008. O círculo mostra
a região de
Guarapuava. Fonte: SOS
Mata Atlântica.



1.3 Marcadores Moleculares

Estudos de biodiversidade molecular são utilizados como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas em diversas áreas a fim de analisar as associações entre espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar e estimar a migração e dispersão entre as populações naturais (Awise, 2004). A ferramenta para esses estudos são os marcadores moleculares, que são *loci* que revelam semelhança ou diferença gênica entre indivíduos de uma determinada espécie o que permite obter informações sobre a diversidade genética (Awise, 2004).

Marcadores moleculares são características de uma determinada região do DNA que permitem diferenciar dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (Milach, 1998). Os marcadores moleculares baseados em DNA podem ser de caráter dominante ou co-dominante. Em indivíduos diplóides, os marcadores co-dominantes permitem visualizar e distinguir ambos os alelos em um *locus*, enquanto que marcadores dominantes não permitem a distinção entre indivíduos homocigotos e heterocigotos (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

A partir do uso dessa importante ferramenta da biologia molecular, é possível investigar de forma eficiente um grande número de indivíduos, populações e espécies em um curto espaço de tempo, proporcionando o conhecimento sobre a variabilidade genética existente em diversos organismos (Ciampi, 2001). Existem várias técnicas utilizadas para estimar a variabilidade genética pela análise direta do DNA. Dentre essas técnicas destacam-se os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). A decisão de qual destes marcadores utilizar depende dos objetivos do trabalho a ser realizado, da estrutura laboratorial disponível e também dos recursos financeiros disponíveis para realização do trabalho.

1.3.1 Marcadores SSR (Simple Sequence Repeat)

Os marcadores SSR, também conhecidos como microssatélites, são os mais polimórficos e consistem em sequências curtas com um a cinco pares de base que se repetem em série, e através desse marcador, é possível identificar um único *locus* no genoma, além da característica codominante de fácil detecção via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (Hamada *et al.*, 1982; Litt e Luty, 1989).

Esses marcadores são desenvolvidos a partir de sequências específicas do genoma da espécie estudada. Essa é uma limitação para a aplicação desses marcadores em estudos de genética de populações de espécies pouco conhecidas, pois demanda tempo e recursos para o desenvolvimento de *primers* específicos de cada espécie (Engel *et al.*, 1996). A técnica mais utilizada para o desenvolvimento desses marcadores é a construção de biblioteca genômica. Essa é uma técnica que demanda tempo e altos recursos pois necessita de digestão de DNA genômico por enzimas de restrição, seleção de regiões com SSR, sequenciamento e sucessivos testes para verificar a qualidade dos *primers* desenvolvidos (Milach *et al.*, 1998; Brondani, 2007). Uma alternativa para utilizar marcadores SSR em espécies pouco estudadas é o emprego de *primers* heterólogos, ou seja, *primers* desenvolvidos para espécies relacionadas, como pertencentes a uma mesma família ou gênero.

Muitos *loci* de SSR estão localizados em regiões não gênicas ou em íntrons (Engel *et al.*, 1996). Esta é uma característica que faz dos SSR uma importante ferramenta para estudos relacionados à biologia evolutiva de diversas espécies, pois sofrem menor ação da seleção natural quando comparado com regiões codificadoras. Esses marcadores apresentam altas taxas de mutação o que permite identificar a variabilidade entre indivíduos, famílias e populações (Hodgetts *et al.*, 2001). Assim, os SSR são utilizados para estimar os níveis de heterozigosidade e fluxo gênico e associá-los com parâmetros importantes para a adaptação da espécie, o que torna esses marcadores os mais indicados para trabalhos de genética de populações (Rafalski *et al.*, 1996; Matioli e Fernandes, 2012).

1.3.2 Marcadores ISSR (Inter simple Sequence Repeat)

Para se utilizar os marcadores SSR é necessário conhecimento prévio do genoma da espécie em estudo. Porém, caracterizar um número considerável de *primers* SSR demanda altos custos e tempo. Para contornar essa problemática, foi desenvolvido um marcador baseado nas sequências SSR sem necessidade de sequenciamento, os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (Zietjewicz *et al.*, 1994).

A técnica para utilizar esse marcador é simples, semelhante à técnica do marcador RAPD. A amplificação dos produtos ocorre via PCR e envolvem amplificações de segmentos de DNA entre duas sequências repetidas de microssatélites idênticas localizadas em direções opostas. Os produtos das amplificações são

geralmente de 200 a 1500 pb de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade. (Bomet *et al.*, 2002).

Como os marcadores SSR são dominantes, em estudos de genética de populações, a utilização de dados obtidos a partir desses marcadores não é tão direto quanto se utiliza um de caráter codominante, como os SSR, por exemplo. Em vista disso, os ISSR têm sido empregados em estudos de variabilidade genética, que permitem, por meio de testes estatísticos específicos contornar essa problemática e estimar índices de variação genética entre indivíduos, populações e espécies (Lynch e Milligan, 1994).

1.4 *Eugenia uniflora* L.

Eugenia uniflora L., 1735 popularmente conhecida como pitangueira, pitanga e no exterior, como *Surinam cherry* ou *Brazilian cherry* (Weyerstahl *et al.*, 1988), pertence à família Myrtaceae, a qual possui em torno de 150 gêneros e aproximadamente 3600 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. O gênero *Eugenia* é o maior da família Myrtaceae, pois inclui aproximadamente 537 espécies e, destas, dois terços são nativas de ecossistemas brasileiros (Landrum e Kawaasaki, 1997; McVaugh, 1956).

Eugenia uniflora é nativa do bioma Mata Atlântica, porém é amplamente distribuída no território brasileiro. A espécie possui porte arbóreo, e suas flores são hermafroditas e pequenas com coloração esbranquiçada. O florescimento ocorre duas vezes ao ano, em janeiro e de agosto a setembro, e a frutificação ocorre em fevereiro e de outubro a novembro (Salgueiro *et al.*, 2004). Os períodos de florescimento e frutificação variam de acordo com a região geográfica.

Um estudo realizado por Silva e Pinheiro (2007) aponta que a antese de *E. uniflora* é diurna, sendo que as flores sobrevivem apenas durante um dia e, nesse período, são visitadas por um grande número de insetos, como himenópteros, dípteros, coleópteros e neurópteros. Entre esses animais, as abelhas da espécie *Apis mellifera* L. são os insetos mais abundantes e considerados, assim, os polinizadores mais efetivo da pitangueira. Quanto à reprodução de *E. uniflora*, a espécie é considerada alógama, porém a autopolinização ocorre mas com baixo rendimento da frutificação (Almeida *et al.*, 2012).

A dispersão dos frutos de pitangueira ocorre por hábitos alimentares de frugívoros, principalmente de lagartos, macacos e outros grandes mamíferos. (Gressler *et al.*, 2006).

O cultivo de pitangueira vem aumentando em razão das propriedades encontradas nos frutos, folhas e flores. Os óleos essenciais com aroma característico extraídos de suas folhas são amplamente utilizados pela indústria de cosmético do país. Os frutos são utilizados para o preparo de polpa, suco, sorvete, geleias e vinhos (Bezerra, 2002). As folhas e flores apresentam propriedades medicinais, o que tem despertado o interesse pela espécie como fonte de produtos farmacológicos. Atualmente as folhas de pitangueira são empregadas para tratamento de azia, redução da pressão arterial e de sintomas da bronquite, cólicas e diversas doenças estomacais. As folhas também apresentam propriedades anti-inflamatórias e estão sendo aplicadas em estudos para tratamento do diabetes (Schapoval *et al.*, 1994).

Vários estudos têm identificado altos níveis de poliploidia na família Myrtaceae (Raven, 1975; Rye, 1979). De acordo com Costa e Forni-Martins (2006), a *E. uniflora* possui 22 cromossomos ($n=11$), o qual é o número básico cromossômico para a família. A análise citogenética realizada por Almeida e colaboradores (2012) em indivíduos das populações naturais de Guarapuava, Paraná e que foram utilizadas no presente estudo comprovou, por meio da determinação do número cromossômico ($2n = 22$), que os mesmos são da espécie *E. uniflora*.

Com o uso de técnicas moleculares, é possível obter informações a respeito da variação genética entre e dentro de populações naturais o que é fundamental para a exploração e/ou conservação da diversidade genética das espécies (Matioli e Fernandes, 2012). São escassos os trabalhos moleculares com pitangueira. Margis e colaboradores (2002) realizaram um estudo de diversidade genética da espécie em áreas de restinga empregando o marcador AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) e Ferreira-Ramos e colaboradores (2008) desenvolveram marcadores SSR para a espécie e analisam a estrutura genética de populações naturais na região de Ribeirão Preto, SP.

1.5 Diversidade genética e fragmentação florestal

Devido a necessidade de elaborar estratégias de conservação, manejo e recuperação dos fragmentos florestais do bioma Mata Atlântica, os estudos em genética da conservação e ecologia são ferramentas importantes para orientar as ações e definir os parâmetros para a reestruturação dessas áreas (Matioli e Fernandes, 2012). As questões fundamentais retratadas em diversos trabalhos são embasadas nos efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações que habitam os poucos remanescentes do bioma. Fenômenos como deriva gênica, endogamia e gargalo de garrafa são considerados e observados em grande parte dos fragmentos florestais (Barret e Kohn, 1991, Young *et al.*, 1996).

A genética da conservação viabiliza meios que possam minimizar os efeitos do isolamento populacional a fim de preservar ao máximo a base genética de cada espécie em seu meio natural. Os dados fornecidos atualmente na literatura demonstram uma variação na sensibilidade de cada espécie aos efeitos da fragmentação florestal (Matioli e Fernandes, 2012).. Os principais fatores que devem ser considerados são tamanho e localização do fragmento e mecanismo de reprodução da espécie estudada. Alguns árvores como a *Eugenia dysenterica* possuem florações rápidas, com duração de poucas horas (Zucchi, 2003). Já indivíduos de *Eugenia uniflora* apresentam florações contínuas em um maior intervalo de tempo, assim como a espécie ameaçada de extinção *Dalbergia nigra* (Salgueiro *et al.*, 2004).

As alterações na estrutura genética de espécies arbóreas em áreas degradadas são decorrentes da sensibilidade dos agentes polinizadores ao isolamento geográfico (Young e Boyle, 2000). Uma das formas de integrar os remanescentes isolados da floresta é pela conexão dos fragmentos por corredores ecológicos que atuam na manutenção do fluxo gênico (Colli, 2003). Para a implantação de alternativas que visam minimizar os efeitos da fragmentação em populações naturais, os estudos genéticos quantificam a variabilidade genética no tempo e espaço dessas populações e permitem um melhor entendimento da ação da seleção natural nessas áreas. Assim, conhecer a variabilidade e estrutura genética entre e dentro de populações auxiliará em práticas mais eficientes de conservação e manejo de espécies nativas (Frankel, 1995).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a estrutura genética de populações de *Eugenia uniflora* L. oriundas de fragmentos da Floresta Ombrófila Mista.

2.2 Objetivos Específicos

1. Estimar a variabilidade genética de uma população de pitangueira isolada e de duas populações que estão conectadas por mata ciliar utilizando marcadores ISSR;
2. Estimar a similaridade genética entre os indivíduos das três populações e a similaridade média entre as populações;
3. Analisar a diversidade genética das populações em estudo utilizando marcadores SSR;
4. Estimar o fluxo gênico entre as três populações estudadas;
5. Determinar os efeitos da fragmentação florestal na estrutura e diversidade genética de populações de pitangueira.

3 MATERIAIS E MÉTODOS E RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia e os resultados e discussão desta dissertação serão apresentados em um capítulo no formato de artigo científico escrito nas normas da revista *Tree Genetics and Genomics* ISSN 1614-2942 (JCR 2.335).

Capítulo 1

ESTRUTURA GENÉTICO-POPULACIONAL DE *Eugenia uniflora* L. (MYRTACEAE) EM FRAGMENTOS FLORESTAIS DE MATA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL.

Bruna Saviatto Fagundes, Cláudia Regina Gobatto, Marcos Ventura Faria, Paulo Roberto Da Silva.

ESTRUTURA GENÉTICO-POPULACIONAL DE *Eugenia uniflora* L. EM FRAGMENTOS FLORESTAIS DE MATA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL.

Bruna Saviatto Fagundes¹, Marcos Ventura Faria^{1,3}, Cláudia Regina Gobatto², Paulo Roberto Da Silva^{1,2}

¹ Programa de Pós – Graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual do Centro – Oeste, Guarapuava, PR, Brasil.

² Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro – Oeste, Guarapuava, PR, Brasil.

³ Departamento de Agronomia, Universidade Estadual do Centro – Oeste, Guarapuava, PR, Brasil.

Autor para correspondência: Paulo Roberto Da Silva, prsilva@unicentro.br

RESUMO

A redução de habitats naturais contribui para a perda de biodiversidade e para o isolamento das populações remanescentes. Uma espécie vegetal com grande representatividade na Mata Atlântica é a *Eugenia uniflora* L., também conhecida como pitangueira. Objetivando investigar os efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações naturais de *Eugenia uniflora*, sete *loci* ISSR e nove *loci* SSR foram amplificados em três populações de fragmentos de Floresta Ombrófila Mista. O coeficiente médio de similaridade entre as populações A, C e D foi de 0,31. A similaridade genética entre os indivíduos da população mais isolada (0,42) foi maior que a similaridade encontrada entre os indivíduos das populações C (0,34) e D (0,36) que, por sua vez, estão conectadas. O agrupamento de todos os indivíduos formou três grupos correspondentes a cada população estudada. Uma alta diversidade genética foi observada entre as três populações ($F_{ST} = 0,34$; $I = 0,51$), sendo que dentro das populações a diferenciação foi maior do que entre as populações, correspondendo a 71,33% e 28,67% respectivamente. A média da diversidade genética dentro das populações ($H_o = 0,33$; $H_e = 0,47$) indica uma deficiência de heterozigotos pelo aumento dos cruzamentos endogâmicos ($F_i = 0,29$) e constitui uma resposta à redução do fluxo gênico ($N_m = 0,48$). De acordo com o agrupamento da distância genética de Nei (1978), a população A e D foram as mais distantes geneticamente. A redução da variabilidade genética da espécie nessas áreas fragmentadas poderá, futuramente, alterar a capacidade adaptativa de *E. uniflora* às mudanças ambientais e interferir na dinâmica de comunidade de espécies associadas.

Palavras – chave: Fragmentação florestal; Conservação; SSR; ISSR; Pitanga.

INTRODUÇÃO

A redução da cobertura florestal em ambientes naturais é resultado do processo de crescimento demográfico e conseqüente expansão das atividades antrópicas, como agricultura, pecuária, industrialização e ocupação urbana (Salgueiro et al. 2004). Uma das conseqüências da perda de habitats é o alto nível de isolamento observado entre

populações em áreas de vegetação nativa. A destruição de habitats é a causa mais expressiva da extinção de espécies (Hanski 1998).

A fragmentação florestal resulta na formação de mosaicos a partir de fragmentos de diversos tamanhos de vegetação nativa em áreas agrícolas e urbanas (Collevatti et al., 2001), induzindo no desenvolvimento de diversas manchas de florestas isoladas umas das outras. Essa redução de habitat contribui para a diminuição da biodiversidade e para o isolamento de populações remanescentes, podendo causar mudanças na história evolutiva das espécies (Bierregaard et al. 1992; Young e Boyle 2000).

Como consequência do isolamento, pode ocorrer diminuição do fluxo gênico entre as populações e crescente deriva genética. Outra consequência da fragmentação é a alteração da estrutura e variabilidade genética das populações isoladas acarretando no aumento dos cruzamentos endogâmicos entre os indivíduos (Ferreira et al. 2002; Estopa et al. 2007), levando a espécie a um possível risco de extinção (Loveless e Hamrick 1984).

A Mata Atlântica é o mais ameaçado dos biomas florestais brasileiros estando reduzida a pequenos fragmentos de florestas, os quais, na maioria das regiões, encontram-se isolados por cidades e extensas áreas agrícolas. Os poucos remanescentes que ainda restam do bioma estão limitados a pequenas manchas de vegetação. A Mata Atlântica é constituída por diversos tipos de florestas, incluindo a Floresta Ombrófila Mista, ou também conhecida como Floresta de Araucária. A delimitação dessa floresta é definida pela presença do pinheiro – do – Paraná (*Araucaria angustifolia*) (MMA, 2002).

Para auxiliar na compreensão da variabilidade genética e estrutura de populações de espécies arbóreas marcadores bioquímicos têm sido utilizados como importantes ferramentas devido a seu caráter co-dominante e baixo custo das análises (Sebben et al., 1998; Seoane et al., 2000; Moraes e Monteiro, 2002). No entanto, os marcadores mais indicados são os baseados em DNA, por não sofrerem influência ambiental. Dentre estes, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e os marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) têm sido amplamente empregados em diversos estudos de variabilidade e estrutura genética de populações (White e Powell 1999; Collevatti et al. 2001; Brondani et al. 2002; Bittencourt 2009; Brandão et al. 2011).

Os marcadores ISSR utilizam uma técnica simples e de baixo custo e apresentam alta reprodutibilidade e geração de altos índices de polimorfismo nos resultados (Reddy et al. 2002). Os ISSR são vantajosos quanto à geração de um grande número de bandas informativas por reação e o fato de não haver a necessidade de conhecimento prévio da sequência do DNA para a construção do *primer* utilizado. Porém sua desvantagem está em seu caráter dominante. Contudo, mesmo apresentando essa característica, os marcadores ISSR são empregados em vários estudos de variabilidade de plantas cultivadas ou nativas como morango (Morales et al. 2011), Jojoba (Sharma et al. 2008a), *Myrcia splendens* (Brandão et al. 2011), *Camellia reticulata* (Wang e Ruan 2012), *Eucalyptus* spp. (Balasaravanan et al. 2005), batata doce (Hu et al. 2003) e *Pennisetum purpureum* (Lima et al. 2011).

Os marcadores SSR possuem a maioria das características desejáveis como a co-dominância que permite que ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto sejam visualizados no gel, multialélicos e estáveis para serem utilizados em análises genéticas e evolução de populações naturais, especialmente em espécies arbóreas altamente heterozigóticas (White e Powell 1997; Collevatti et al. 1999; Brondani et al. 2002; Zucchi 2003).

Eugenia uniflora L., também conhecida como pitangueira é uma espécie pertencente à família Myrtaceae com importante representatividade no bioma Mata Atlântica e a sua distribuição no território brasileiro abrange os estados de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (Lorenzi 2002). A pitangueira possui os grãos de pólen como único recurso floral, responsável pela transferência dos caracteres genéticos e atração dos polinizadores, dentre eles, as abelhas, o polinizador mais efetivo (Almeida et al. 2012).

Segundo Lynch e Milligan (1994) o conhecimento da distribuição da variação genética entre e dentro de populações é de fundamental importância para a conservação e exploração comercial de espécies presentes em fragmentos florestais. A pitangueira é uma espécie utilizada em áreas de reflorestamento de mata ciliar. Sua alta incidência em fragmentos de Floresta Ombrófila Mista é determinante para a utilização dessa espécie em recuperação de áreas degradadas. Porém é necessário determinar o nível de sensibilidade dessa espécie à fragmentação florestal por meio de estudos de variabilidade e estrutura genética e subsidiar a elaboração de estratégias de conservação e recuperação de áreas fragmentadas. Neste trabalho foi verificado o efeito da

fragmentação florestal na estrutura genética de três populações de *Eugenia uniflora* L. utilizando marcadores ISSR e SSR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

Foram avaliadas três populações de *E. uniflora* oriundas de fragmentos de Floresta Ombrófila Mista, localizados no município de Guarapuava, estado do Paraná, Brasil. Foram amostradas 20 árvores adultas, da mesma geração, de cada população. A denominação e a caracterização dos fragmentos foram descritas por Almeida e colaboradores (2012). A população denominada “A” está localizada em um fragmento de oito hectares isolado de qualquer outro fragmento florestal por áreas agrícolas. Essa população se encontra a oeste da cidade de Guarapuava (Figura 1). As populações denominadas “C” e “D” estão localizadas em fragmentos de 60 e 35 hectares respectivamente. Esses fragmentos se encontram conectados entre si e a outros fragmentos florestais por mata ciliar que acompanha o Rio das Pedras. Essas populações se encontram a leste da cidade de Guarapuava (Figura 1). Para este trabalho não foi possível coletar material biológico da população presente no fragmento B estudado por Almeida e colaboradores (2012).

Extração de DNA Vegetal

Folhas jovens de 20 árvores de cada população foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da extração do DNA. O DNA foi extraído de acordo com protocolo proposto por Sharma (2008b). O tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido; 1 mL de tampão de extração (20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 2M NaCl, 2% CTAB, 2% PVP, 2% β -mercaptoethanol) foi adicionado ao tubo contendo 100 mg de tecido; os tubos foram levados ao banho maria a 65 °C por 30 min. O DNA foi separado da solução por precipitação com fenol:clorofórmio:alcoólisoamílico (25:24:1) e centrifugação. Posteriormente, o DNA foi precipitado com PEG (*Polyethylene Glycol*) e sucessivas lavagens com etanol foram realizadas para obter um material genético de alto grau de pureza. Após a extração, o DNA foi ressuscitado em TE (10mM Tris-HCl; pH 8,0; 1mM EDTA), tratado com RNase a 37 °C por 30 min, e armazenado a -20 °C até o uso.

Amplificação via PCR-SSR

Foram testados 21 *primers* SSR. Desses, 13 *primers* foram desenvolvidos para *Eucalyptus* spp. por Brondani et al. (1998), denominados primers Embra, sete foram desenvolvidos para *Eugenia uniflora* L. por Ferreira-Ramos et al. (2008), denominados primers Eun, e um par de *primer* foi desenvolvido para *Melaleuca alternifolia* por Rosseto e colaboradores (1999), denominado Scutt052. Todos esses *primers* já foram utilizados em outros estudos de diversidade genética com espécies pertencentes à família Myrtaceae (Ramos 2008; Zucchi 2003). Dos 13 *primers* desenvolvidos para *Eucalyptus* spp., 10 *primers*, somente os *primers* Embra14, Embra63 e Embra210 foram utilizados em estudos de genética de populações em *Eugenia uniflora*.

Para os pares de *primers* Embra e Eun, as reações de amplificação via PCR foram conduzidas em um volume final de 10 µL contendo: 25 ng de DNA, 2,5 µM de cada *primer*, 250 µM de cada dNTP, 1,0 mM de MgCl₂ e 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em 1 X de tampão para PCR. Para o *locus* Scutt052, as reações foram conduzidas em um volume final de 15 µL contendo: 30 ng de DNA, 2,5 µM de cada *primer*, 250 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) 1X de tampão para PCR. Para a amplificação o termociclador foi programado para desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30s, temperatura de anelamento do *primer* por 1min e 72°C por 1min, e por fim 72°C por 15 minutos para extensão final dos fragmentos. As temperaturas de anelamento de cada *locus* estão detalhadas na tabela 1. Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹). Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 bp. O resultado da eletroforese foi visualizado em luz UV e fotodocumentado com sistema digital.

Amplificação via PCR-ISSR

Para as análises moleculares foram testados 12 *primers* ISSR. As reações de amplificação do DNA de cada genótipo via PCR foram conduzidas em volume final de 12,5 µL contendo: 20 ng de DNA, 0,2µM de *primer*, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 1 U de Taq DNA Polimerase e 1X de tampão para PCR. Para a amplificação o termociclador foi programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45s, temperatura de anelamento dos primers por 45s e 72°C por 90s, e por fim foi feito um passo a 72°C por 5 minutos para extensão final dos

fragmentos. As sequências dos *primers* utilizados e suas respectivas temperaturas de anelamento estão detalhadas na Tabela 3. Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb. O resultado da eletroforese foi visualizado em luz UV e fotodocumentado com sistema digital.

Análises Estatísticas- SSR

Os indivíduos foram genotipados para cada *loci* SSR. Com os dados foi gerada uma matriz genotípica de acordo com os alelos presentes em cada indivíduo para cada *locus*. Os parâmetros genéticos das populações analisadas foram estimados usando o programa GDA (*Genetic Data Analysis*) e o número de alelos por *locus*, heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), os índices de fixação de Wright e a distância genética de Nei (1978) foram calculados.

Análises Estatísticas- ISSR

Somente os primers que apresentaram produtos de amplificação com bom padrão de resolução foram considerados. Os indivíduos foram genotipados de acordo com a presença (1) e ausência (0) de bandas e uma matriz binária foi construída a partir desses dados. A porcentagem de polimorfismo de cada *primer* ISSR foi calculada pela contagem direta dos fragmentos amplificados. A similaridade genética entre os indivíduos foi mensurada pelo *software* NTSYS 2.2 utilizando o coeficiente de Jaccard e o dendrograma de similaridade entre os indivíduos foi desenhado pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). A análise de variância molecular (AMOVA) foi feita utilizando o *software* ARLEQUIN versão 3.11 determinando assim os índices de diferenciação genética de Φ_{ST} (F_{ST}) e a variância entre os componentes e seus níveis de significância. O índice de diversidade de Shannon foi mensurado pelo do *software* POPGENE versão 1.32.

RESULTADOS

Dos 21 pares de *primers* SSR testados nove pares apresentaram produtos de amplificação de tamanho esperado (Tabela 1). A combinação dos nove *loci* SSR gerou o total de 29 alelos, com média de 3,2 alelos por *locus*, sem a presença de alelos exclusivos em cada população. O menor número de alelos foi de 2 para os *loci* Embra123, Embra148 e Eun121 e o maior número de alelos foi de 5 para o *locus* Embra14 (Tabela 1).

O número total de alelos por *locus*, a heterozigosidade observada (H_o) e a esperada (H_e) para cada *locus* estão detalhados na Tabela 2. A heterozigosidade observada variou de 0 (Embra148) a 0,71 (Eun11) (Tabela 1). A menor heterozigosidade esperada foi de 0,20 para o *locus* Embra123 e o *locus* Embra14 apresentou a maior heterozigosidade esperada de 0,73. A média para todos os *loci* da heterozigosidade observada foi 0,33 e de heterozigosidade esperada foi 0,50.

A média da heterozigosidade observada nas três populações foi 0,33 e da heterozigosidade esperada foi 0,47. Os valores de coeficiente de endogamia para as três populações variaram entre 0,25 a 0,32, com média de 0,29 (Tabela 2). A estatística F calculada pelo método de Weir e Cockerham (1984) indicou níveis positivos para os valores de F_{IS} , F_{IT} , e F_{ST} (0,29; 0,63 e 0,34, respectivamente).

As distâncias genéticas de Nei (1978) variaram de 0,10 a 0,67. De acordo com o agrupamento, a população A foi a mais distante geneticamente da população D (Figura 2).

Dos 12 *primers* ISSR testados, sete apresentaram qualidade na amplificação. Estes *primers* produziram um total de 87 *loci* variando no tamanho de 200 a 1400pb, com média de 12 *loci* por *primer*. Desses *loci* analisados, 83 foram polimórficos correspondendo a 95,4% do total (Tabela 3).

O coeficiente médio de similaridade entre as populações A, C e D foi de 0,31. Entre os indivíduos de uma mesma população foram estimados os valores de 0,42, 0,34 e 0,36 para as populações A, C e D, respectivamente. O dendrograma obtido pelo agrupamento de todos os indivíduos formou três grupos sendo cada grupo representativo de cada uma das populações em estudo (A, C e D) (Figura 3). A média da similaridade genética entre os indivíduos de uma mesma população é maior na população A (0,42) e menor entre os indivíduos das populações C (0,34) e D (0,36). No dendrograma o grupo dos indivíduos da população A apresentam ramificações mais próximas de 1 do que os indivíduos das populações C e D (Figura 3). Ao analisar a

similaridades genéticas entre os indivíduos de uma mesma população foi observado que na população A o maior valor foi de 0,80 e o menor foi de 0,21. Na população C e D os maiores valores foram respectivamente de 0,54 e 0,61 e os menores de 0,13 e 0,15. Na população A foi observado também que o número de similaridades maior que 0,5 foi de 56 enquanto as populações C e D estes números foram bem menores (10 e 19 respectivamente).

O índice de diversidade de Shannon para a espécie foi de 0,5131 (Tabela 4). Dentro das populações foram encontradas variações da distância genética de Nei de 0,2517 a 0,3133 e índices de diversidade de Shannon de 0,3848 a 0,4718 (Tabela 4).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) indicou diferenciação entre as populações de 28,67% e dentro das populações de 71,33% (Tabela 5). O índice de fixação (F_{ST}) médio entre as três populações foi de 0,28674.

DISCUSSÃO

Transferibilidade de *primers* SSR

O conhecimento da estrutura genética de populações de espécies nativas é um importante aliado para a genética da conservação. Uma das ferramentas para esse tipo de estudo são os marcadores microssatélites (SSR). Porém o desenvolvimento desses marcadores demanda alto custo e tempo. Uma alternativa para contornar essa problemática é a utilização de *primers* heterólogos. A transferibilidade de *primers* SSR de espécies relacionadas para a espécie em estudo é uma importante ferramenta para viabilizar estudos de genética de populações. *E. uniflora* possui apenas sete marcadores específicos desenvolvidos por Ferreira-Ramos (2008). Todos esses *loci* foram testados nesse trabalho, mas somente cinco apresentaram produto de amplificação (Tabela 1). Os outros dois *loci* são nulos nessas populações. Os *loci* nulos não são amplificados via PCR e não são detectados na genotipagem dos indivíduos e a consequência nos resultados é um número muito maior de homozigotos causando um desvio nas proporções do equilíbrio de Hardy Weinberg (Aldrich et al. 1998; White et al. 1999).

Dos *primers* utilizados nesse trabalho, 13 foram desenvolvidos para *Eucalyptus*. Esses *primers* foram utilizados em estudos de genética de populações com *Eugenia dysenterica* e *Acca sellowiana*, ambas as espécies pertencem à família Myrtaceae (Zucchi 2003; Santos 2007). A transferibilidade desses marcadores entre espécies relacionadas é uma consequência da homologia entre sequências de microssatélites. Os

loci de *Eucalyptus* spp. transferidos para *E. uniflora* nesse trabalho mostram conservação de regiões microssatélites no genoma de espécies da família Myrtaceae. Vários estudos tem mostrado que *primers* SSR desenvolvidos para uma espécie apresentam grande potencial de serem utilizados em estudos genéticos de espécies relacionadas (Da-Silva et al. 2011). O potencial de transferibilidade de cada *primer* depende da conservação das regiões que flanqueiam o SSR e dos sítios de ligação desses *primers* e muitos estudos tem demonstrado a alta conservação dessas regiões flanqueadoras de SSR em espécies arbóreas, o que pode explicar os altos índices de transferibilidade de SSR entre espécies da mesma família (Kijas et al. 1995; Cipriani et al. 1999; Billotte et al. 2001; Hodgetts et al. 2001; Yamamoto et al. 2001; Dirlewanger et al. 2002; Wunsch e Hormaza 2002; Rosseto et al. 2002; Shepherd et a., 2002; Rallo et al. 2003; Zucchi 2003).

Estrutura Genética de *Eugenia uniflora*

O isolamento de populações naturais pela fragmentação florestal reduz a heterozigosidade média com o aumento de cruzamentos endogâmicos e, conseqüentemente, aumenta a diferenciação genética entre populações diferentes. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram as populações de *Eugenia uniflora* estudadas estão estruturadas geneticamente.

A média da diversidade genética dentro das populações ($H_o = 0,33$) é considerada um pouco baixa quando comparada com os índices de heterozigosidade de espécies arbóreas de fecundação cruzada, como a cerejeira (0,74) e araucária (0,52) (Sanou et al. 2005; Bittencourt 2009; Ganopoulos 2011). As médias da heterozigosidade observadas em populações naturais de *E. uniflora* da região de São Paulo ($H_o = 0,31$) e de populações do Rio de Janeiro ($H_o = 0,30$) (Margis et al. 2002; Ferreira-Ramos et al. 2008) não variaram da média das populações estudadas nesse trabalho. A baixa média de heterozigotos nas populações naturais de *Eugenia uniflora* pode ser característica da própria espécie e, além disso, a presença de alelos nulos pode aumentar a média de homozigotos na população. Em estudos genéticos por meio de marcadores SSR heterólogos, os alelos nulos implicam na ocorrência de índices baixos de heterozigotos em função da deleção da região microssatélite em um *loco* específico ou por mutações nos sítios de ligação do *primer* (Callen et al. 1993, Lehman et al. 1996).

O índice de Shannon (*I*) não utiliza a heterozigosidade para estimar a variabilidade genética nas populações. Os valores encontrados com esse índice variam

de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a diversidade genética. Na população A de *E. uniflora* o índice de Shannon foi maior, mas muito próximo, (0,47) que nas populações C e D (0,40 e 0,38 respectivamente). A população A teve a maior diferenciação genética em relação às populações conectadas C e D. A similaridade genética média entre os indivíduos foi maior na população A (0,42) do que entre os indivíduos das populações C e D (0,34 e 0,36 respectivamente). A variação genética é fundamental para a adaptação da espécie as alterações no ambiente (Torggler et al. 1995). A variabilidade genética dentro das populações de *E. uniflora* estudadas (71,33%) é maior do que entre as populações. Em geral, a variabilidade genética dentro de populações é maior em espécies tropicais predominantemente alógamas (Loveless e Hamrick 1984; Hamrick e Godt 1996; White et al. 1999; Nybom 2004; Apte et al. 2006; Brandão et al. 2011) como em *Swietenia macrophylla* (87,9%), *Hippohae rhamnoides* (79,1%) e *Calycophyllum spruceanum* (91%) (Gillies et al. 1999; Bartish et al. 1999; Russel et al. 1999).

O valor de F_{ST} (Φ_{ST}) foi de 0,28 e 0,34, a partir das análises com o marcador ISSR e SSR, respectivamente. De acordo com Wright (1978), valores de F_{ST} acima de 0,25 indicam uma diferenciação genética elevada. Sabe-se que populações completamente isoladas podem não apresentar cruzamento ao acaso, o que aumenta o coeficiente de endogamia nesses fragmentos isolados. Em populações naturais de *Myrcia splendens*, uma espécie da família Myrtaceae, o valor de F_{ST} encontrado com o marcador ISSR foi de 0,03 (Brandão et al. 2011). Esse valor de variação genética encontrado em populações naturais de *M. splendens* é em razão das populações estarem situadas em regiões com sistemas de corredores ecológicos conectando os fragmentos. Em outras espécies arbóreas os valores de diferenciação genética foram de 0,16 para araucária e 0,09 para cerejeira (Bittencourt 2009; Ganopoulos 2011). Em *Araucaria angustifolia*, espécie que caracteriza a Floresta Ombrófila Mista, não houve alteração na estrutura genética das populações estudadas em diferentes regiões. A Araucária é uma espécie de vida longa e possui longos intervalos de reprodução. Porém, as espécies arbóreas associadas no mesmo ambiente apontam uma sensibilidade à fragmentação florestal (Auler et al. 2002; Behling 1997; Sousa e Hattemer 2003).

De acordo com a distância genética de Nei (1978), a população A está mais distante geneticamente da população D (Figura 3). Essas duas populações estão situadas

em áreas geograficamente distantes limitando as trocas genéticas entre os indivíduos dessas populações.

A estruturação genética das populações estudadas pode ser consequência do polinizador efetivo de *Eugenia uniflora* ser restrito a pequenas distâncias do ninho. A capacidade de deslocamento de grãos de pólen a longas distâncias é crucial para a reprodução de espécies que habitam áreas fragmentadas (Dunphy 2004). As abelhas do gênero *Apis* são os visitantes mais comuns nas árvores da família Myrtaceae. Porém, o forrageamento dessas abelhas não é superior a 10 km e, portanto não é suficiente para o fluxo de polens entre a população isolada (A) e as populações conectadas (C e D). O fragmento A está isolado por uma distância superior a 12 km dos demais fragmentos C e D pela área urbana de Guarapuava. Os fragmentos C e D estão localizados a uma distância de 6 km em uma área conservada e com diversos fragmentos de vegetação nativa, incluindo corredores ecológicos de mata ciliar que acompanha rios. Assim, os animais dispersores de pólen e semente podem se deslocar entre um fragmento e outro pela curta distância existente entre eles. Isso não ocorre entre a população A e os demais fragmentos estudados, pois o que isola essa população é uma área urbana, inviabilizando, a transição de animais responsáveis pelo fluxo gênico entre os fragmentos estudados aumentando os efeitos de deriva genética nessa população. Ou seja, o isolamento da população poderá refletir, possivelmente, em uma diferenciação genética por deriva. A maioria das espécies arbóreas depende de insetos polinizadores para realizar fecundação cruzada e o comportamento desses polinizadores é alterado com a redução do tamanho populacional (Wilcock e Neiland 2002; Kwak et al. 1998; Steffan-Dewenter e Tschardt 1999; Honnay e Jacquemyn 2006).

Segundo Morato e Campos (2000) as abelhas, principais agentes polinizadores de *E. uniflora* são muito sensíveis à fragmentação de ambientes. Essa sensibilidade pode estar associada à redução das fontes de alimento, escassez de locais para a nidificação e alterações bruscas na temperatura do ambiente. A maioria das espécies arbóreas de fecundação cruzada é dependente de agentes polinizadores e uma vez que os fragmentos florestais são conectados por corredores de vegetação, a divergência genética é reduzida pelo aumento do fluxo gênico e a migração dos agentes polinizadores e dispersores de sementes dessas espécies é facilitada pela conexão existente entre os fragmentos (Brandão et al., 2011). O fluxo de polens é o maior responsável pelo fluxo gênico entre populações, porém a migração de sementes da espécie *E. uniflora* também pode ser responsável pela manutenção da variabilidade

genética. Os maiores consumidores do fruto pitanga são mamíferos, aves e alguns répteis (Gressler et al. 2006). Porém, as sementes da pitanga apresentam um tamanho representativo o qual não pode ser engolido pelas principais aves presentes na Floresta Ombrófila Mista. Os mamíferos e répteis provavelmente não apresentam um grande deslocamento entre as áreas fragmentadas em decorrência do fragmento A estar isolado dos demais por uma área urbana.

Almeida e colaboradores (2012) demonstraram que há menor fertilidade dos grãos de pólen nos indivíduos da população A (82%) em relação à fertilidade polínica dos indivíduos das populações C e D (96% e 97%, respectivamente). Essa diferença corrobora com a análise da estrutura genética dessas populações de *E. uniflora*. O fragmento isolado (A) apresenta um tamanho reduzido em comparação aos fragmentos C e D. A redução no tamanho do fragmento isolado aumenta a probabilidade de cruzamentos endogâmicos e, como consequência, reduz a variabilidade genética dessa população e sabe-se que a fertilidade do grão de pólen pode estar diretamente relacionada com a condição genética da planta (Pagliarini 2000).

A fragmentação florestal e consequente isolamento de populações reduz a variabilidade genética pela diminuição do tamanho populacional. O efeito gargalo é uma consequência da redução amostral de populações, pois os indivíduos que ali permanecem representam apenas uma pequena parcela do conjunto gênico original dessa população (Hartl e Clark 2007). A tendência para essa população agora isolada é a perda de alelos, o que irá acarretar em baixa heterozigosidade (Barret e Kohn 1991; Charlesworth 1987). Outra causa que pode estar associada à ocorrência da divisão das populações em unidades reprodutivas diferenciadas é efeito Wahlund, conhecido pelo redução na frequência de heterozigotos em razão da subdivisão das populações naturais e consequente aumento da coancestria (Wright, 1978). A cidade de Guarapuava apresenta um predomínio de áreas agrícolas isolando em pequenas ilhas os fragmentos de Floresta Ombrófila Mista. Quando há conexão entre fragmentos é por corredores ecológicos constituídos de mata ciliar que são impostos pela legislação (Almeida et al. 2012).

Os índices de diversidade genética obtidos pelos marcadores SSR e ISSR indicam que as populações de *E. uniflora* aqui estudadas estão estruturadas geneticamente e no futuro podem apresentar maiores alterações da variabilidade genética. Essas alterações sugerem que efeitos como endogamia, efeito Wahlund e deriva genética possivelmente ocorram nas populações naturais em razão da

fragmentação florestal. *Eugenia uniflora* é representativa de espécies arbóreas da Mata Atlântica, assim estes dados podem auxiliar na compreensão dos efeitos da fragmentação nas demais espécies arbóreas de fecundação cruzada presentes no mesmo bioma. Esta sensibilidade das espécies arbóreas da Mata Atlântica às alterações no habitat indica a necessidade de elaboração de estratégias de preservação para a conservação da biodiversidade em remanescentes que ainda apresentam altos níveis de variabilidade.

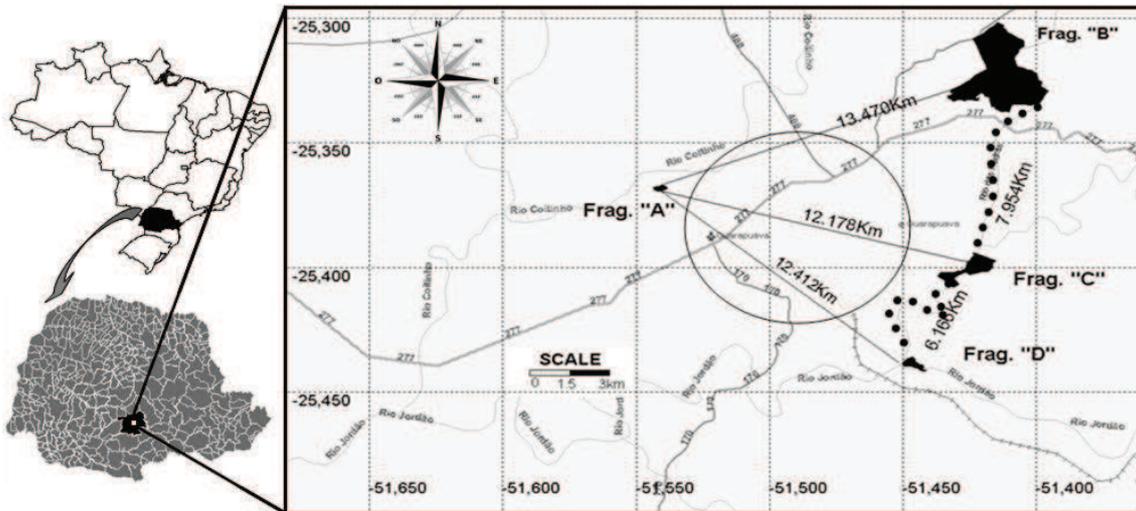


Figura 1. Localização das populações de *Eugenia uniflora* utilizadas nesse trabalho. A área circulada corresponde à cidade de Guarapuava, PR (Almeida et al. 2012).

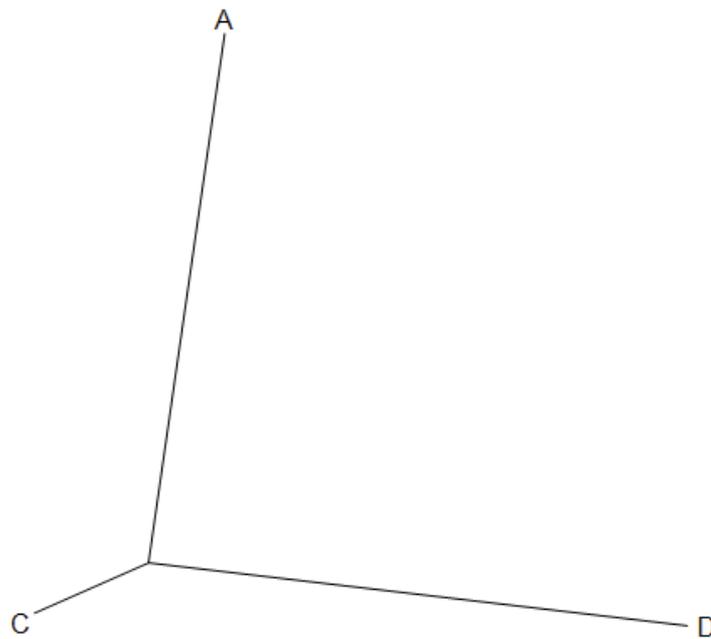


Figura 2. Dendrograma gerado com dados SSR baseado na distância genética de Nei (1978) construído pelo método Neighbor-joining.

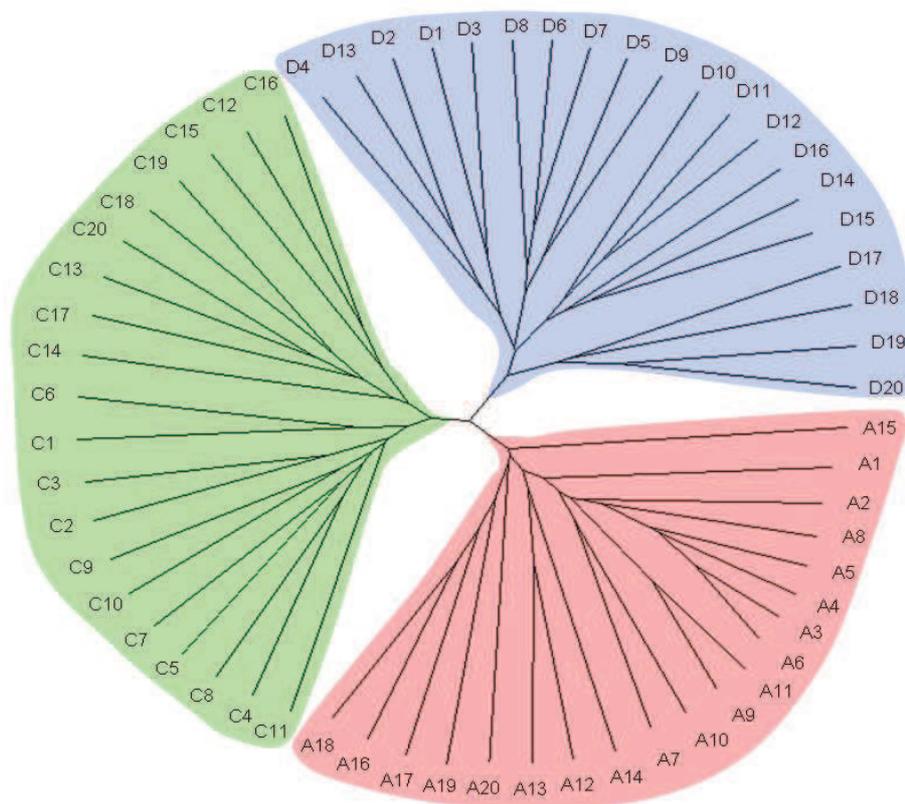


Figura 3. Dendrograma gerado com os dados dos marcadores ISSR pelo método de agrupamento UPGMA dos indivíduos das populações de *E. uniflora* estudadas. O coeficiente de similaridade utilizado foi o de Jaccard.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados, seguido do respectivo tamanho de fragmento esperado, número de alelo por *locus* (A), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e temperatura de anelamento (T_a).

<i>Locus</i> SSR	Acesso GenBank	T_a	Tamanho do Fragmento esperado (pb)	A	H_o	H_e
Embra14	G74881	50°	95 – 170	5	0,10	0,73
Embra123	BV682244	50°	180 – 300	2	0,23	0,20
Embra148	BV682248	50°	200 – 320	2	0,00	0,37
Embra166	BV682113	50°	130 – 300	4	0,66	0,71
Eun2	EU000456	56°	182 – 208	4	0,30	0,52
Eun5	EU000458	54°	140 – 162	4	0,21	0,40
Eun11	EU000460	52°	162 – 182	3	0,71	0,66
Eun21	EU000462	52°	198 – 212	3	0,53	0,65
Eun121	EU000464	54°	205 – 215	2	0,26	0,23
Media				3,2	0,33	0,50
Total				29		

Tabela 2. Estimativas de parâmetros genéticos em três populações de *Eugenia uniflora*. H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; F_{IS} : índice de fixação.

População	H_o	H_e	F_{IS}
A	0,35	0,46	0,25
C	0,35	0,49	0,29
D	0,31	0,31	0,32
Média	0,33	0,47	0,29

Tabela 3. Primers ISSR e temperatura de anelamento utilizada para cada primer (T°a) número de bandas produzidas, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo de cada locus (%).

Primer	Seq (5'-3')	T°a	NB	NBP	% P
807	(AG) ₈ T	52	13	12	92,3%
808	(AG) ₈ C	50	16	16	100%
810	(GA) ₈ T	50	16	16	100%
815	(CT) ₈ G	53	6	5	83,3%
835	(AG) ₈ YC	54	15	15	100%
864	(ATG) ₆	50	14	13	92,8%
873	(GACA) ₄	50	7	6	85,7%
Total	-	-	87	83	95,4%

NB: número de bandas produzidas; NBP: número de bandas polimórficas.

Tabela 4. Diversidade Genética em *Eugenia uniflora*. N: número de indivíduos; h: diversidade genética de Nei (1973); I: índice diversidade de Shannon.

População	Número de indivíduos	Diversidade Genética de Nei (h)	Índice de diversidade de Shannon (I)
A	20	0,3133	0,4718
C	20	0,2629	0,4024
D	20	0,2517	0,3848
Total	60	0,3395	0,5131

Tabela 5. Análise da Variância Molecular (AMOVA) de três populações de *E. uniflora*.

Origem da variação	g.l.	Soma dos Quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação	P
Entre as Populações	2	250,75	5,5753Va	28,67	< 0,001
Dentro das Populações	57	790,5	13,8684 Vb	71,33	< 0,001
Total	59	1041,25	19,44375		

Índice de Fixação F_{ST}: 0,28674

Referências

- Aldrich PR, Hamrick JL, Chavarrige P, Kochert G (1998) Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology* 7:933-944
- Almeida DJ, Faria MV, Silva PR Da (2012) Effect of forest fragmentation on microsporogenesis and pollen viability in *Eugenia uniflora*, a tree native to the Atlantic Forest. *Genetic and Molecular Research* Sep 20;11(AOP)
- Apte GS, Bahulikar RA, Kulkarno RS, Lagu Suresh HS, Rao PSN, Gupta VS (2006) Genetic diversity analysis in *Gaultheria fragrantissima* Wall (Ericaceae) from the two biodiversity hotspots in India using ISSR markers. *Current Science* 91:1634-1640
- Auler NMF, Reis MS, Guerra MP, Nodari RO (2002) The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 25:329-338
- Balasarayanan T, Chezhian P, Kamalakannan R, Ghosh M, Yasodha R, Varghese M, Gurusurthi K (2005) Determination of inter- and intra-species genetic relationships among six *Eucalyptus* species based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *Tree Physiol.* 25: 1295–1302
- Barrett SCH, Kohn J (1991) The genetic and evolutionary consequences of small population size in plant: implications for conservation. *Genetics and Conservation of Rare Plants* 3–30

- Bartish IV, Jeppsson N, Nybom H (1999) Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Data* 8: 791-802
- Behling H (1997) Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the Araucaria forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil). *Review of Paleobotany and Palynology* 97:109-121
- Billotte N, Risterucci AM, Barcelos E, Noyer JL et al (2001) Development, characterization, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) microsatellite markers. *Genome* 44: 413-425
- Bierregaard RO, Lovejoy TE, Kapos V, Santos AA, Hutchings W (1992) The biological dynamics of tropical rainforest fragments. *BioSciences* 42: 859-866
- Bittencourt JVM, Sebbenn, AM (2009) Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil. *Tree Genetics & Genomes* (Print) 5: 573-582
- Brandão MM, Vieira FA, Carvalho D de (2011) Fine-scale genetic structure of *Myrcia splendens*(Myrtaceae). *Rev. Árvore* 35: 957-964
- Brondani RPV, Brondani C, Grattapaglia D (2002) Towards a genus wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. *Molecular Genetics and Genomics* 267: 338-347
- Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R, Grattapaglia D (1998) Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *Europhylla*. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 816-827
- Callen, D.F.; Thompson, A.D.; Shen, Y.; Philips, H.A.; Richards, R.I.; Mulley, J.C. and Sutherland, G.R. (1993) Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.* 52. 922-927
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Rev. Ecol. Syst.* 18: 237–268
- Cipriani G, Lot G, Huang WG, Marrazzo MT et al (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterization and cross-species application in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.* 99: 65-72
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 349-356
- Da-Silva PR, Milach SCK, Tisian LM (2011) Transferability and utility of white oat (*Avena sativa*) microsatellite markers for genetic studies in black oat (*Avena strigosa*). *Genetics and Molecular Research.* 10 (4): 2916-292
- Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana J, et al (2002) Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L). *Theor. Appl. Genet.* 105: 127-138
- Dunphy BK, Hamrick JL, Schwagerl J (2004) A comparison of direct and indirect measures of gene flow in the bat-pollinated tree *Hymenaea courbaril* in the dry forest life zone of southwestern Puerto Rico. *Int. J. Plant. Sci.* 165: 427– 436
- Estopa RA, Ramalho MAP, Peçanha Rezende GDS, Abad JIM, Gonçalves FMA (2007) Performance of inbred and outbred *Eucalyptus* spp. *Cerne*, Lavras
- Ferreira MAJ, Queiroz MA De, Vencovsky R, Braz LT, Vieira MLCR, Borges ME (2002) Sexual expression and mating system of watermelon: implications in breeding programs. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 75: 171-177

- Ferreira-Ramos R, Laborda PR, Santos MO, Mayor MS, Mestriner MA, Souza AP, Alzate-Marin AL (2008) Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L through of newly developed SSR markers. *Conservation Genetics* 9: 1281-1285
- Ganopoulos I, Aravanopoulos AF, Argiriou A, Kalivas A, Tsaftaris A (2011) Is the genetic diversity of small acattered forest tree populations at the southern limits of their range more prone to stochastic events? A wild cherry case study by microsatellite-based markers. *Tree Genetics & Genomes* 7: 1299-1313
- Gillies ACM et al. (1999) Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. *Heredity* 83: 722-732
- Gressler E, Pizo MA, Morellato LPC (2006) Pollination and seed dispersal of Myrtaceae in Brazil. *Rev. Bras. Bot.* 29: 509-530
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plants species. *Phil. Trans. Roy. Soc. London Biol. Sci.* 351:1291-1298
- Hanski I (1998) Metapopulation dynamics. *Nature* 396: 41-49
- Hartl DL, Clark AG (2007) Principles of Population Genetics, Fourth Edition 565 p
- Hodgetts RB, Aleksuk MA, Brown A, Clarke C, et al (2001) Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca*) and related species. *Theor. Appl. Genet.* 102: 1252-1258
- Honnay O, Jacquemyn H (2007) Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conservation Biology* 21:823-831
- Hu J, Nakatani M, Lalusin AG, Kuranouchi T, Fujimura T (2003) Genetic analysis of sweet potato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Breeding Science* 53: 297-304
- Kijas JM, Fowler JC, Thomas MR (1995) An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome* 38: 349-355
- Kimura M, Weiss GH (1964) The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 561-576
- Kwak MM, Velterop O, Andel V (1998) Pollen and gene flow in fragmented habitats. *Applied Vegetation Science* 1:37-54
- Lehman, T. et al. (1996) An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics*. 144: 1155-1163
- Lima RSN, Daher RF, Goncalves LSA, Rossi Da Amaral Junior AT, Pereira MG, Ledo FJS (2011) RAPD and ISSR markers in the evaluation of genetic divergence among accessions of elephant grass. *Genetics and Molecular Research* 10: 1304-1313
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-95
- Lorenzi, H (2002) Brazilian Trees. 2nd edn. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo
- Margis R, Félix DB, Soares JFC, Salgueiro F, Araujo DSD, Breyne P, Montagu MV, Oliveira DE, Margis-Pinheiro M (2002) Genetic differentiation among three neighbouring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. *Biodiversity and Conservation* 11:149-163
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. (2002) Proposta do grupo de trabalho preservação e recuperação da Floresta Ombrófila Mista no Estado de Santa Catarina. Portaria Ministerial 49 de 06 de fevereiro de 2002, Brasília, Brasil, p 77.
- Moraes PLR, Monteiro R (2002) Outcrossing rates of a natural population of *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). *Biota Neotropica* 2:2

- Morales, RGF Resende JTV, Faria MV, Andrade MC, Resende LV, Delatorre CA, Silva PR Da (2011) Genetic similarity among strawberry cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Scientia Agricola* 665-670
- Morato EF, Campos LAO (2000) Effects of Forest fragmentation on solitary wasps and bees in Central Amazonia II Vertical stratification. *Rev. Bras. Zool.* 17: 429-444
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155
- Pagliarini MS (2000) Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. *Genet. Mol. Biol.* 23: 997- 1002
- Salgueiro F, Felix D, Caldas JF, Margis-Pinheiro M, Margis R (2004) Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from Brazilian coastal Atlantic forest. *Diversity and Distributions* 10: 201-210
- Sanou H, Lovett PN, Bouvet J-M (2005) Comparison of quantitative and molecular variation in agroforestry populations of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* CF Gaertn) in Mali. *Molecular Ecology* 14:2601–2610
- Santos KL, Welter LJ, Dantas AC, Mesquita Guerra MP, Ducroquet JP, Nodari RO (2007) Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. *Genetics and Molecular Biology* 30: 73-70
- Sebbenn AM, Kageyama PY, Vencovsky R (1998) Genetic variability, mating system and the spatial genetic structure in *Genipa americana* L though isozyme markers. *Scientia Forestalis* 53: 15-30
- Seoane CES, Kageyama PY, Sebbenn AM (2000) Forest fragmentation effects in population genetic structure of *Esenbeckia leiocarpa* Engl (Guarantã). *Scientia Forest* 57:123-139
- Sharma K, Agrawal V, Gupta S, Kumar R, Prasad M (2008a) ISSR marker-assisted selection of male and female plants in a promising dioecious crop: jojoba (*Simmondsia chinensis*). *Plant Biotechnol. Rep.* 2:239–243
- Sharma K, Ajay KM, Raj SM (2008b) A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. *African Journal of Biotechnology* 7: 1018-1022
- Shepherd M, Cross M, Maguire L, Dieters J, et al (2002) Transpecific microsatellites for hard pines. *Theor. Appl. Genet.* 104: 819-827
- Sousa VA, Hattemer HH (2003) Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. *Australian Journal of Botany* 51:309-317
- Steffan-Dewenter I, Tschardt T (1999) Effects of habitats isolation on pollinator communities and seed set. *Oecologia* 121:432-440
- Rallo P, Tenzer I, Gessler C, Baldoni L, et al. (2003) Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. *Theor. Appl. Genet.* 107: 940-946
- Reddy MP, Sarla N, Reddy EA (2002) Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17
- Rossetto M, Mclaucchlan A, Harris FCL, Henry RJ, Baverstock PR, Lee LS, Maguire TL, Edwards KJ (1999) Abundance and polymorphism of microsatellite markes in tea tree (*Melaleuca alternifolia* – Myrtaceae). *Theor. App. Genet.* 98: 1091-1098
- Russell JR, Weber JC, Booth A, Powell W, Sotelo-Montes C, Dawson IK (1999) Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin,

- revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Molecular Ecology* 8:199-204
- Torggler MGF Contel EPB Torggler SP (1995) *Isozymes: genetic variability in plants*. Ribeirão Preto: SBG, 186p
- Wang BY Ruan ZY (2012) Genetic diversity and differentiation in *Camellia reticulata* (Theaceae) polyploidy complex revealed by ISSR and ploidy. *Genetic and Molecular Research* 11: 503-511
- White GM Boshier DH Powell W (1999) Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology* 8: 1899-1909
- Wilcock CC, and Neiland R (2002) Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science* 7:270–277
- Wright S (1978) *Evolution and the genetics of populations*. Chicago: University of Chicago, 580p
- Wunsch A and Hormaza JI (2002) Molecular characterization of sweet cherry (*Prunus avium* L) genotypes using peach [*Prunus persica* (L) Batsch] SSR sequences. *Heredity* 89: 56-63
- Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB, Chaves LJ, Coelho ASG, Vencovsky R (2003) Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genet. Mol. Biol.* 26: 449-457
- Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Kotobuki K, et al. (2001) SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor Appl Genet* 102: 865-870
- Young A, Boyle TJ (2000) *Forest fragmentation Forest conservation genetics: principles and practice* Collingwood. Csiro Publishing 123-132

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a utilização dos marcadores moleculares foi possível averiguar os efeitos da fragmentação florestal nas populações de pitangueira localizadas em fragmentos de Floresta Ombrófila Mista.

Os resultados obtidos indicam que a população A (isolada) apresenta uma maior similaridade genética entre os indivíduos do que as populações C e D. As médias de heterozigosidade entre as três populações não apresentaram grandes diferenças. Porém, no futuro, efeitos como deriva gênica, efeito Wahlund e endogamia ocorram na população isolada diminuindo a frequência de alelos e aumente a média de homozigotos nessa área em função da fragmentação florestal.

O emprego dos marcadores moleculares foi eficiente para averiguar os efeitos da fragmentação florestal nas populações de pitangueira. Os resultados obtidos com os dois marcadores moleculares permitem observar restrição no fluxo gênico entre as populações de *E. uniflora*. Em fragmentos isolados, como é o caso da população A, há maior probabilidade de ocorrer a fixação ou eliminação de alelos no futuro. Os índices de F_{ST} observados com o uso de ambos os marcadores indicam uma diferenciação genética entre as populações estudadas.

Com base nos dados de similaridade, índice de Shannon e F_{ST} é possível afirmar que a espécie em estudo apresenta variabilidade genética menor na população em fragmento isolado em relação aos valores encontrados para as populações ainda conectados por vegetação. A pitangueira é representativa de espécies arbóreas da Mata atlântica. Estes dados podem auxiliar o desenvolvimento de ações conservacionistas para espécies arbóreas de fecundação cruzada nativas do mesmo bioma. A sensibilidade de *E. uniflora*, que foi observada com os dois marcadores moleculares, às alterações no habitat refletem a necessidade de inserção de políticas de preservação para a conservação da biodiversidade em remanescentes que ainda apresentam altos níveis de variabilidade.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLCOCK, A.L.; CHAUVET, M.; CRANDALL, K.A.; GIVEN, D.R.; HALL, S.J.G.; IRIONDO, J.M.; LEWINSOHN, T.M.; LYNCH, S.M. SOLE-CAVA, A.M.; STACKEBRANDT, E.; TEMPLETON, A.R. and WATTS, P.C. Genetic diversity as a component of biodiversity. In: Heywood, V.H.; Watson, R.T. (eds). **Global Biodiversity Assessment**. Cambridge: Cambridge University Press, p.57-88. 1995.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Sinauer Inc., 2nd ed., 2004.
- BARRET, S.C.H.; KOHN, J.R. **Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation**. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E., ed. Genetics and conservation of rare plants. Oxford: Oxford University Press, 1991. p. 3-30.
- BEZERRA, J.E.F.; SILVA JR., J.F. e LEDERMAN, I.E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Serie Frutas Nativas. Jaboticabal: Funep, v.1, p.30, 2000.
- BIERREGAARD, R.O.; LOVEJOY, T.E.; KAPOV, V.; SANTOS, A.A.; HUTCHINGS, W. The biological dynamics of tropical rainforest fragments. **BioSciences**. v42, p.859-866. 1992.
- BOMET, B.; GORAGUER, R.; JOLY, G.; BRANCHARD, M. Genetic diversity in European and Argentinean cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Genome**. v.45, p. 481-484. 2002.
- BORNET, B; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat ISSR Markers; reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular BIOLOGY Reporter**. v.19, p. 209-215. 2001.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **O corredor central da Mata Atlântica: uma nova escala de conservação da biodiversidade**. Brasília: MMA, 46 p. 2006.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual Prático para o Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites em Plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. 2007.
- CARVALHO, K.S.; VASCONCELOS, H.L. Forest fragmentation in central Amazonia and its effects on litter-dwelling ants. **Biological Conservation**. v. 91, p.151-157. 1999.
- CIAMPI, A, Y.; MAGALHÃES, M. T. Q. de. **Análise da variabilidade genética de três espécies arbóreas utilizando marcador molecular RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 8 p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 60). 2001
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**. v.10, p. 349-356. 2001.
- COLLI, G. R., ACCACIO, G. M., ANTONINI, Y., CONSTANTINO, R., FRANCESCHINELLI, E. V., LAPS, R. R., SCARIOT, A. O., VIEIRA, M. V.;

WIEDERHECKER, H. C. A. **Fragmentação dos ecossistemas e a biodiversidade brasileira: uma síntese.** In: RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. O. (Orgs.). Fragmentação de ecossistemas. Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2003. p. 317-324.

COSTA, I.R. and FORNI-MARTINS, E.R. Chromosome studies in species of *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from south-eastern Brazil. **Aust. Jour. Bot.**, v.54, p.409-415, 2006.

ENGEL, S.R., LINN, R.A., TAYLOR, J.F. and DAVIS, S.K. Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. **J. Mammology.** v.2, p.504-518, 1996.

ESTOPA, R.A.; RAMALHO, M.A.P.; PEÇANHA REZENDE, G.D.S.; ABAD, J.I.M.; GONÇALVES F.M.A. Performance of inbred and outbred *Eucalyptus spp.* **Cerne**, Lavras. 2007.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética.** EMBRAPA-CENARGEM, Documento 20, 1995. 220p.

FERREIRA, M.A.J.; QUEIROZ, M.A. DE; VENCOVSKY, R.; BRAZ, L.T.; VIEIRA, M.L.C.R.; BORGES, M.E. Sexual expression and mating system of watermelon: implications in breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.75, p. 171-177. 2002.

FERREIRA-RAMOS, Ronai ; LABORDA, P. R. ; SANTOS, M. O.; MAYOR, M. S. ; MESTRINER, M. A. ; SOUZA, A. P.; ALZATE-MARIN, A. L. . Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics**, v. 9, p. 1281-1285, 2008.

FONSECA, C. R. et al. Princípios modernos de manejo florestal e a conservação da biodiversidade associada à Floresta com Araucária. In: FONSECA, C. R. et al. (Eds.). **Floresta com Araucária: ecologia, conservação de desenvolvimento sustentável.** Ribeirão Preto: Holos, p.287-295. 2009.

FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J. **The conservation of plant biodiversity.** Cambridge: Cambridge University, 1995. 299 p.

GASCON, C.; LOVEJOY, T.E. Ecological impacts of forest fragmentation in central Amazonia. **Zoology.** v.101, p.273-280. 1998.

GRESSLER, E.; PIZO, M.A. and MORELLATO, L.P.C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Rev. Bras. Bot.**, v.29, n.4, p.509-530, 2006.

HAMADA, H.; PETRINO, M.C.; TAKUGANA, T. A novel repeated element with Z-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.79, p.6465-6469, 1982.

HUECK, K. **Distribuição e habitat natural do pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia*).** Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade de São Paulo, n.10, p.1-24, 1953.

- KAGEYAMA, P. Y. Conservação “In situ” de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, Piracicaba, v. 35, p. 7-37, 1987.
- LANDRUM, L.R. e KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: An illustrated synoptic and identification keys. **Brittonia**, v.49, p.508-536, 1997.
- LAURANCE, W.F.; VASCONCELOS, H.L.; LOVEJOY, T.E. Forest loss and fragmentation in the Amazon: implications for wildlife conservation. **Oryx**.v. 34, p. 39-45. 2000.
- LEITE, P. F.; KLEIN, R. M. Vegetação. In: IBGE. Geografia do Brasil: Região Sul. v. 2, Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, p. 113 – 150. 1990.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v.15, p. 65-95. 1984.
- LYNCH, M., AND B. MILLIGAN. Analysis of population-genetic structure using RAPD markers. **Molecular Ecology**. v. 3, p. 91-99. 1994.
- MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Temporal and spatial allozyme variation in the South American cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). **Biochemical Genetics**, v. 41, p. 219-233, 2003.
- MÄHLER JR, J. K. F.; LAROCCA, J. F. Fitosionomias, desmatamento e fragmentação da Floresta com Araucária. In: FONSECA, C. R. et al. (Eds.). **Floresta com Araucária: ecologia, conservação de desenvolvimento sustentável**. Ribeirão Preto: Holos, p.243-252. 2009.
- MATIOLI, S.R. (Org.); FERNANDES, F. M. C. (Org.). **Biologia molecular e evolução**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, v. 1. 2012. 250p.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. Proposta do grupo de trabalho preservação e recuperação da Floresta Ombrófila Mista no Estado de Santa Catarina. Portaria Ministerial 49 de 06 de fevereiro de 2002, Brasília, Brasil, p 77. 2002.
- MARGIS, R.; FELIX, D.; CALDAS, J.F., SALGUEIRO, F.; De ARAUJO, D.S.D.; BREYNE, P.; Van MONTAGU, M.; De OLIVEIRA, D.; MARGISPINHEIRO, M. Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. **Biodiv. Conserv.** v.11, p.149-163, 2002.
- MCVAUGH, R. The tropical American Myrtaceae - an interim report. **Taxon**, v.17, n.4,p.354-418, 1968.
- MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Editora: UFRGS, 1998.
- RAFALSKI, J.A.; MORGANTI, M.; POWELL, W.; VOGEL, J.M. and TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIERREN, B. et al. (Ed.). **Analysis of**

- non-mammalian genomas: a practical guide.** New York: Academia Press, p.75-134, 1996.
- RAVEN, P.H. The bases of Angiosperm Phylogeny: Cytology. **Annals of the Missouri Botanic Garden**, v.62, p.724-764, 1975.
- REDDY, M.P.; SARLA, N.; REDDY, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**. n. 128, p. 9-17. 2002.
- RYE, B. Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. **Aust. J. Bot.**, v.27, p.547-573, 1979.
- SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J.F.; MARGIS-PINHEIRO, M. and MARGIS,R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, v.10, p.201-210, 2004.
- SCARIOT, A. Forest fragmentation effects on palm diversity in central Amazonia. **The Journal of Ecology**. v.87, p.66-76. 1999.
- SCHAPOVAL, E.E.S.; SILVEIRA, S.M.; ALICE, C.B. and HENRIQUES, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. J. **Ethnopharmacol.**, v.44, p.137-142, 1994.
- SILVA, A.L.G. e PINHEIRO, M.C.B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Acta bot. bras.**, v.21, n.1, p.235-247, 2007.
- VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, I. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal.** Rio de Janeiro: IBGE, 1991.
- WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL-WEYERSTAHL, M.; CHRISTIANSEN, C.; OGUNTMEIM, B.O.; ADEOYE, O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. **Planta Med.** v.54, p. 546-549. 1988.
- YOUNG, A.; BOYLE, T.J. Forest fragmentation Forest conservation genetics: principles and practice Collingwood. **Csiro Publishing**. 123-132, 2000.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome Fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) - anchored PCR amplification. **Genomics**. v.20, p. 176-183. 1994.
- ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO J.B.; CHAVES L.J.; COELHO A.S.G. and VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genet. Mol. Biol.**, v.26, n.4, p.449-457, 2003.