

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre UNICENTRO e UEPG)

**Diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa* Berg.  
oriundas de fragmentos da Mata Atlântica**

**LUCAS FERNANDO DA SILVA**

Guarapuava

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre UNICENTRO e UEPG)

**Diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa* Berg.  
oriundas de fragmentos da Mata Atlântica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da 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).

Guarapuava

2012

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da UNICENTRO, Campus Guarapuava

Silva, Lucas Fernando da  
S586d Diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa*  
Berg. oriundas de fragmentos da Mata Atlântica / Lucas Fernando da Silva. –  
– Guarapuava, 2012  
xi, 58 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, em associação ampla  
com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013

Orientador: Paulo Roberto da Silva  
Co-orientador: Luciano Farinha Watzlawick  
Banca examinadora: Luciana Paes de Barros Machado, Claudete  
Aparecida Mangolin, Marcos Ventura Faria

#### Bibliografia

1. Biologia evolutiva. 2. Guaviroveira. 3. Fragmentação de habitat. 4.  
Genética de populações. 5. Conservação. 6. Marcadores moleculares. I.  
Título. II. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva.

CDD 574.52642

Orientador

Prof. Dr. PAULO ROBERTO DA SILVA

Co-orientador

Prof. Dr. LUCIANO FARINHA WATZLAWICK

*I am ahead, I am advanced  
I am the first mammal to make plans, yeah  
I crawled the earth, but now I'm higher  
It's evolution, baby  
Do the evolution  
Come on, come on, come on  
(Pearl Jam)*

## **Agradecimentos**

Ao meu Orientador professor Doutor Paulo Roberto Da Silva, por idealizar e possibilitar este trabalho, bem como me auxiliar a amadurecer cientificamente, profissionalmente e pessoalmente.

Ao meu Co-orientador professor Doutor Luciano Farinha Watzlawick pelo auxílio e contribuições no trabalho.

Aos professores Luciana Paes de Barros Machado, Claudete Aparecida Mangolin, Marcos Ventura Faria e Rogério Pincela Mateus por suas brilhantes contribuições neste trabalho.

Aos meus parceiros de laboratório Bruna Saviatto Fagundes e Wagner André Fagundes.

À Mailson Poczynek, por permitir e participar prontamente de coleta na propriedade de sua família.

Ao amigo Cristiano Marcondes Pereira pela contribuição científica e participação geral, desde o início do mestrado.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe pelo amor incondicional de sempre.

A minha namorada Elaine Guibes pelo apoio e compreensão.

Aos meus colegas de república pelo companheirismo.

Ao governo do Estado do Paraná pela licença para conclusão do mestrado.

A todos que direta ou indiretamente participaram de maneira positiva desta minha fase de mestrando.

Muito obrigado.

# Lista de Figuras

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Figura 1:** Fragmentação da Mata Atlântica no Brasil. A área em amarelo representa a cobertura original da Mata Atlântica; a área verde representa os remanescentes da mata no ano de 2008. Fonte: SOS Mata Atlântica ..... 3

**Figura 2:** Fragmentação da Mata Atlântica no Paraná. A área em amarelo representa a cobertura original da Mata Atlântica; a área verde representa os remanescentes da mata no ano de 2008. O círculo mostra a região de Guarapuava. Fonte: SOS Mata Atlântica..... 3

**Figura 3:** Características da espécie em estudo, *Campomanesia xanthocarpa* Berg. a) Árvore adulta; b) Folhas e flores; c) Folhas e frutos. Fotos: Lucas Fernando da Silva e Wagner André Fagundes. .... 10

## CAPÍTULO 1

**Figura 1:** Localização das três populações de *C. xanthocarpa* Berg. estudadas neste trabalho (A, B e C). A linha pontilhada indica a área urbana do município de Guarapuava, PR - Brasil. .... 29

**Figura 2:** Perfil eletroforético do *primer* 807 obtido pela amplificação por PCR do DNA genômico da população A de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR, Brasil. M: Marcador de pares de bases de DNA. .... 29

**Figura 3:** Dendrograma de agrupamento dos 60 indivíduos das três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, Pr – Brasil, segundo o coeficiente de Jaccard e método UPGMA..... 10

**Figura 4:** Distribuição gráfica tri-dimensional baseada no relacionamento genético entre os 60 indivíduos das três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR – Brasil. .... 10

**Figura 5:** Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de Nei (1978), construído pelo método UPGM, entre as três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR - Brasil. .... 31

## CAPÍTULO 2

**Figura 1:** Localização das três populações de *C. xanthocarpa* Berg. estudadas neste trabalho (A, B e C). A linha pontilhada delimita a área urbana do município de Guarapuava, PR - Brasil. .... 48

**Figura 2:** Perfil eletroforético obtido com o par de *primer* Eun7 em *C. xanthocarpa* Berg. (População B), mostrando a amplificação de três alelos. M: Marcador de pares de bases de DNA (Ladder 100pb)..... 48

**Figura 3:** Dendrograma de agrupamento das três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR – Brasil, pelo método UPGMA, baseado na Distância genética de Nei (1978). .... 48

**Figura 4:** Dendrograma de agrupamento dos 60 indivíduos das três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR - Brasil, pelo método UPGMA, baseado na Similaridade genética de Jaccard..... 49

## Lista de Tabelas

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1:** *Primers* ISSR selecionados para o estudo da diversidade genética em populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR - Brasil. .... 28

**Tabela 2:** Índices genéticos obtidos com os dados de seis *primers* ISSR em três populações de *C. xanthocarpa* Berg. a região de Guarapuava, PR - Brasil, utilizando o programa PopGene. .... 28

**Tabela 3:** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR – Brasil. .... 28

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1:** Conjunto dos 13 pares de *primers* SSR desenvolvidos na família *Myrtaceae* utilizados para análise da estrutura genético-populacional de *C. xanthocarpa*. Temperatura de anelamento (TA); Tamanho esperado dos fragmentos em pares de bases (pb); Número de alelos amplificados (NA); Heterozigosidade esperada (He); Heterozigosidade observada (Ho) e Índice de Fixação de alelos (Fis). .... 47

**Tabela 2:** Dados genético-populacionais de *C. xanthocarpa* obtidos com a amplificação de 13 pares de *primers* SSR. .... 47

## SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
REVISÃO DE LITERATURA.....	1
Mata atlântica.....	1
Floresta ombrófila mista (FOM).....	1
Fragmentação e genética de populações.....	4
Diversidade genética com auxílio de marcadores.....	5
Marcadores moleculares SSR ou Microsatélites.....	6
Marcadores ISSR.....	7
<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.....	8
OBJETIVOS.....	11
Geral.....	11
Específicos.....	11
MATERIAIS E MÉTODOS E RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
<b>CAPÍTULO 1: Diversidade genética de populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg. oriundas de fragmentos da Mata Atlântica</b> .....	13
RESUMO.....	14
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Área de estudo e material biológico.....	16
Extração do DNA, PCR e Eletroforese.....	17
Análise estatística.....	17
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO.....	19
Polimorfismo e locos exclusivos.....	19
Similaridade genética entre as populações.....	20
Agrupamentos UPGMA e distribuição gráfica dos indivíduos.....	20
Estruturação genética das populações.....	21
Diversidade genética.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
TABELAS.....	28
FIGURAS.....	29
<b>CAPÍTULO 2: Transferibilidade de marcadores SSR da Família Myrtaceae para <i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg. e utilização em estudos de estrutura genético- populacional</b> .....	32
RESUMO.....	33
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
Área de estudo e material biológico.....	37
Extração do DNA e teste de transferibilidade dos <i>primers</i> SSR heterólogos.....	37
Análises nas populações.....	38
RESULTADOS.....	39
Discussão.....	40
Transferibilidade.....	40
Similaridade genética.....	40
Variabilidade genética.....	40
Estrutura das populações.....	42
CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
TABELAS.....	47
FIGURAS.....	48
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## RESUMO

### **Diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa* Berg. oriundas de fragmentos da Mata Atlântica.**

A fragmentação florestal é uma realidade em todos os biomas florestais do mundo. Dentre os Biomas mais fragmentados está a Mata Atlântica. A espécie *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae) é nativa da Mata Atlântica, arbórea frutífera, com alta importância ecológica e com potencial na indústria cosmética e alimentícia. Estudos genéticos afim de verificar o efeito da fragmentação em populações deste espécie são escassos. Assim, este trabalho teve como objetivo determinar parâmetros genético-populacionais de três populações de *C. xanthocarpa* sendo uma população isolada (A) e duas interligadas por corredores de mata (B e C) e com base nos parâmetros determinados, estimar o efeito da fragmentação nas populações em estudo. Neste estudo foram utilizados seis marcadores moleculares ISSR (*inter simple sequence repeat*) e 13 SSR (*simple sequence repeat*). Para os marcadores SSR primeiramente foram feitos a análise de transferibilidade de primers de outras espécies da família Myrtaceae. Foram testados 21 pares de primers, destes 13 foram transferidos com sucesso para *C. xanthocarpa*. Para as análises moleculares foram utilizados o DNA de 20 árvores de cada população. Os *primers* ISSR geraram 64 locos polimórficos, enquanto que os 13 *primers* (locos) SSR geraram 46 alelos. A similaridade genética média entre as populações, estimada pelo coeficiente de Jaccard, foi de 42% e 41%, com ISSR e SSR, respectivamente. Estes valores indicam alta diversidade genética entre as populações. Os agrupamentos dos indivíduos e populações, feitos pelo método UPGMA com dados dos dois marcadores, baseados em coeficientes diferentes (Jaccard e Nei 1978), agruparam os indivíduos de acordo com a população a qual pertencem, com exceção do dendrograma baseado na similaridade com os dados SSR, isolou somente os indivíduos da população A. A distribuição gráfica dos indivíduos baseada no relacionamento genético entre eles apresentou resultado semelhante aos dendrogramas indicando robustez nas análises e reforçando a estruturação das populações. O teste de AMOVA realizado com os dados ISSR mostrou que a maior parte da variação genética está dentro das populações (67%). Os valores de  $F_{st}$  (0,33) e  $G_{st}$  (0,26) obtidos indicam alto nível de diferenciação genética entre as populações. Valores encontrados a partir dos dados SSR remetem a deficiência de heterozigotos considerando o conjunto das populações ( $F_{it}$ = 0,21) e também alto nível de diferenciação genética entre elas ( $F_{st}$ =0,19). Também foram estimados com os dados ISSR valores de  $H_o$ =0,42 (Shannon-Weaver) e  $H_e$ =0,28 (Nei 1973). O número estimado de alelos ( $N_a$ =1,84) com ISSR mostrou-se superior ao número efetivo de alelos ( $N_e$ =1,47), sendo suficiente para manter a atual heterozigosidade. Com os dados do marcador codominante, foi observado alta porcentagem de locos polimórficos ( $P$ =87,18%). A heterozigosidade média observada com os marcadores SSR entre as populações ( $H_o$ =0,46) mostrou-se muito próxima a esperada ( $H_e$ =0,47). Com os dados SSR foram encontrados cinco alelos exclusivos nas populações B e C e com os dados ISSR seis locos exclusivos foram observados na população B. Os resultados obtidos indicam que a população B (conectada com outros fragmentos) apresenta maior diversidade genética, enquanto que o contrário ocorre com a população A (isolada), e a população C valores intermediários. Os resultados sugerem também que, apesar de haver certa diversidade dentro das populações de *C. xanthocarpa*, está ocorrendo processo diferenciação genética entre elas, bem como há perda de variabilidade genética na população A, o que provavelmente é devido ao isolamento das populações condicionado pela fragmentação florestal.

**Palavras-chave:** Guaviroveira; Fragmentação de habitat; Genética de populações; Conservação; Marcadores moleculares.

## ABSTRACT

### **Genetic diversity in populations of *Campomanesia xanthocarpa* Berg. from Atlantic Forest fragments.**

Forest fragmentation is a reality in all forest biomes of the world. Among the Biomes more fragmented is Atlantic Forest. The species *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae) is native to the Atlantic Forest, fruit tree, with high ecological importance and potential in the cosmetics and food industry. Genetic studies to verify the effect of fragmentation on populations of this species are lacking. This study aimed to determine population-genetic parameters of three populations of *C. xanthocarpa* being an isolated population (A) and two connected by corridors of forest (B and C) and based on determined parameters, estimate the effect of fragmentation on populations under study. This study used six ISSR (inter simple sequence repeat) markers and 13 SSR (simple sequence repeat) markers. For the SSR markers were first made transferability analysis of primers from other species from Myrtaceae family. We tested 21 primer pairs, these 13 were successfully transferred to *C. xanthocarpa*. For molecular analyzes were used DNA from 20 trees per population. The ISSR primers generated 64 polymorphic loci, whereas the 13 primers (loci) generated 46 SSR alleles. The average genetic similarity between populations, estimated by Jaccard coefficient was 42% and 41%, with ISSR and SSR, respectively. These values indicate high genetic diversity among populations. The groupings of individuals and populations, made by UPGMA method with data from the two markers, based on different coefficients (Jaccard and Nei 1978), grouped individuals according to the population to which they belong, with the exception of the dendrogram based on similarity with the data SSR, only isolated individuals from the population A. The graphical distribution of individuals based on genetic relationships among them and dendrograms showed similar results indicating robustness in the analysis and reinforcing the structure of populations. The test performed with AMOVA based on ISSR data showed that most of the genetic variation is into populations (67%).  $F_{st}$  values (0.33) and  $G_{st}$  (0.26) show a high level of genetic differentiation between populations. Values found with the SSR data refer heterozygotes deficiency considering all populations ( $F_{it} = 0.21$ ) and also a high level of genetic differentiation between them ( $F_{st} = 0.19$ ). Were also estimated with ISSR data the values of  $H_o = 0.42$  (Shannon-Weaver) and  $H_e = 0.28$  (Nei 1973). The estimated number of alleles ( $N_a = 1.84$ ) with ISSR was superior to the effective number of alleles ( $N_e = 1.47$ ), being sufficient to maintain the current heterozygosity. With data from codominant marker was observed high percentage of polymorphic loci ( $P = 87.18\%$ ). The average observed heterozygosity with SSR markers among populations ( $H_o = 0.46$ ) was very close to the expected ( $H_e = 0.47$ ). With the SSR data were found five unique alleles in populations B and C and with data ISSR six exclusive loci were observed in the population B. The results indicate that the population B (connected with other fragments) shows greater genetic diversity, while the opposite occurs with the population A (isolated), and population C show intermediate values. The results also suggest that, although there is some diversity in populations of *C. xanthocarpa*, is occurring genetic differentiation between them, and loss of genetic variability in the population A, which is probably due to the isolation of populations conditioned by forest fragmentation.

**Keywords:** Guaviroveira; Habitat fragmentation; Population genetics; Conservation; Molecular markers.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Mata atlântica

A Floresta Atlântica é formada por diversos ecossistemas e configura-se num mosaico de diferentes composições e organizações de fauna e flora, que variam de acordo com as características dos ambientes que apresenta ao longo de sua ampla área de abrangência (IBAMA, 2012). A Mata Atlântica é a segunda maior floresta neotropical em tamanho e a quinta em riqueza de espécies do mundo, com altos níveis de endemismo. Este bioma é considerado um dos maiores e mais ameaçados centros de biodiversidade, o que o caracteriza como uma das oito áreas prioritárias (*hotspots*) do planeta em termos de estratégias de conservação (ZIPPARRO et al., 2005).

A Mata Atlântica ocupa toda a costa brasileira e já chegou a interiorizar aproximadamente 500 km na Região Sul do Brasil, que apresenta uma das maiores concentrações desta floresta (BRASIL, 2012). Atualmente restam apenas cerca de 7% da área original da Mata Atlântica preservada no Brasil, fragmentada em pequenas áreas remanescentes (BRASIL, 2012) (Figura 1). O estado do Paraná, localizado na região Sul do país, apresentava originalmente 98% do seu território coberto pela Mata Atlântica, atualmente restam apenas aproximadamente 10% (Figura 2). Uma das regiões fitoecológicas encontradas na Mata Atlântica e de maior concentração no estado do Paraná, é a Floresta Ombrófila Mista (VELOSO et al., 1991).

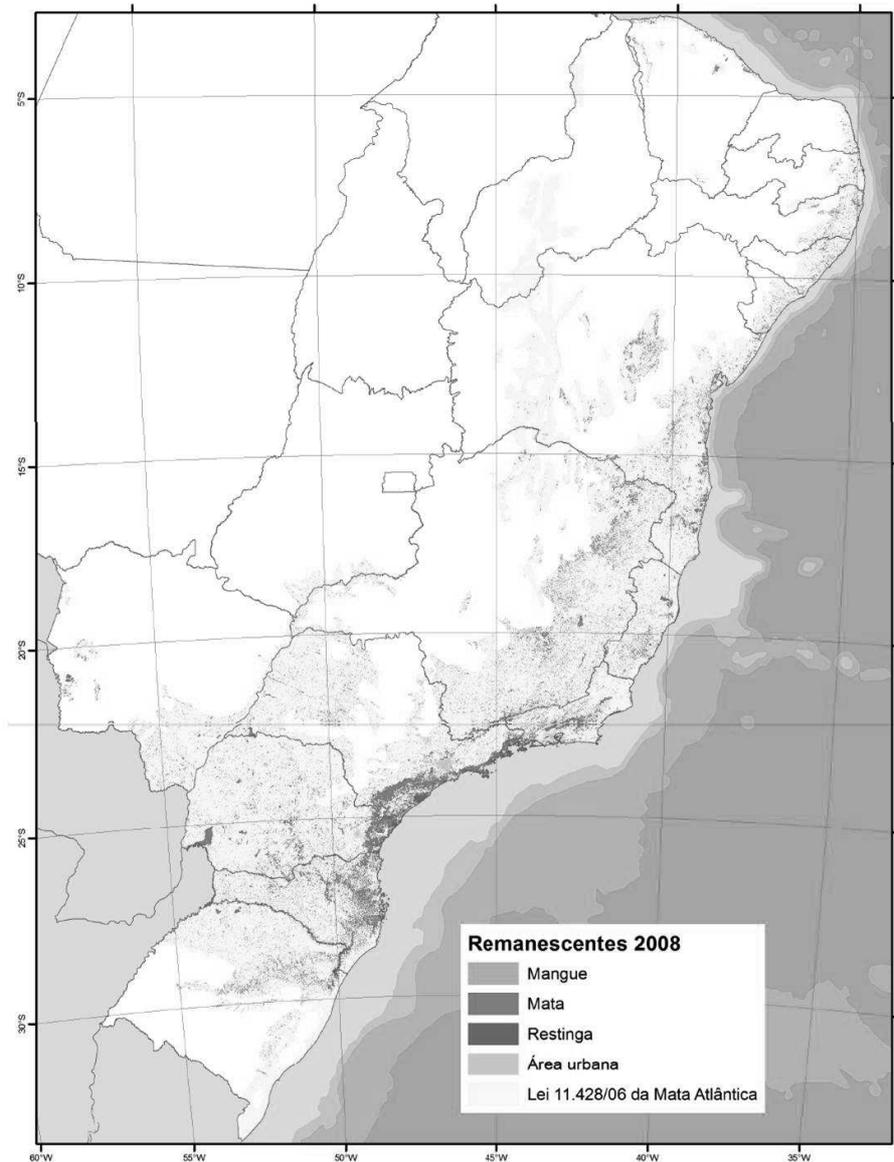
### 1.2. Floresta Ombrófila Mista (FOM)

A FOM é resultante do encontro de floras de origem austral-andina e tropical afro-brasileira e apresenta diferentes composições, organizações e relações florísticas de acordo com as altitudes, climas, entre outras características de sua área de abrangência. Esta Floresta caracteriza grande parte da paisagem da região Sul do país (KLEIN, 1960; KANIESKI, 2010) e é caracterizada pela presença de *Araucária angustifolia* (Bert.) O. Ktze. ou pinheiro-do-paraná, como espécie dominante.

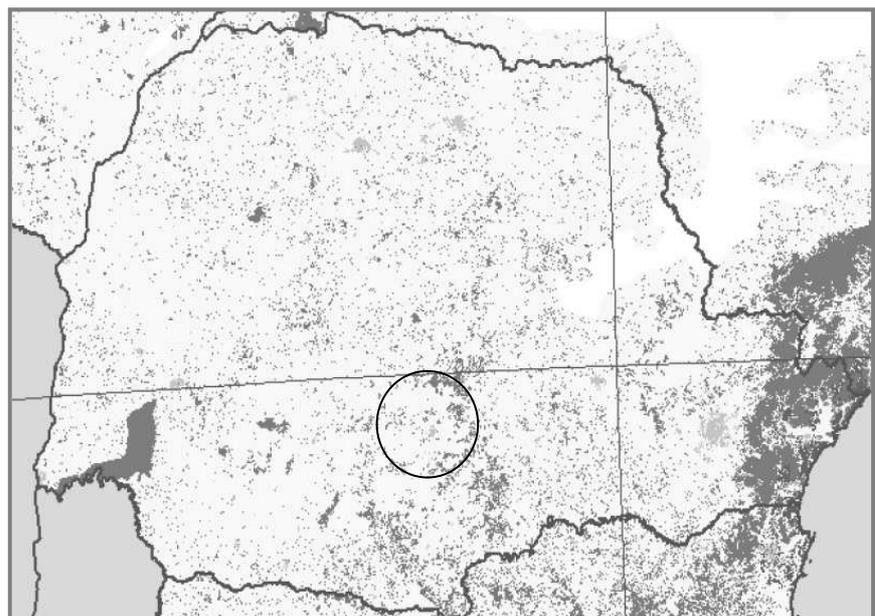
A FOM está entre as tipologias florestais mais ameaçadas atualmente, no entanto existem poucos estudos sobre esta floresta. Estima-se que originalmente, esta formação florestal ocupava cerca de 200.000 km<sup>2</sup> no Brasil (BRASIL, 2002). Grande parte das populações de *Araucária* foi devastada devido à exploração de madeira, expansão das fronteiras agropecuárias, bem como pelos reflorestamentos com espécies exóticas de crescimento rápido (SAWCZUK et al., 2011). A FOM destaca-se por seu valor ecológico, pois abriga espécies e características biológicas únicas em todo o planeta, além da importância

comercial e histórica dos seus recursos no desenvolvimento da região Sul do Brasil (KLEIN,1960). Cerca de 40% da FOM concentrava-se originalmente no Estado do Paraná. No entanto, atualmente o estado encontra-se longe de sua cobertura vegetal original, restando apenas cerca de 1 a 2% da FOM preservada (KOCH; CORRÊA, 2002) (Figura 2).

**Figura 1.** Fragmentação da Mata Atlântica no Brasil. A área em amarelo representa a cobertura original da Mata Atlântica; a área verde representa 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 representa os remanescentes da mata no ano de 2008. O círculo mostra a região de Guarapuava. Fonte: SOS Mata Atlântica.



### **1.3. Fragmentação e genética de populações**

Vários autores citam a fragmentação e redução de habitats como um dos impactos humanos mais significativamente negativos ao ambiente. As manchas florestais formadas pelo processo de fragmentação de habitats podem isolar indivíduos e espécies que antes habitavam uma mesma metapopulação (ZORZETTO et al., 2003), formando populações menores que segundo Hartl e Clark (1997) são unidades locais de uma espécie formadas pela estruturação geográfica ou ação antrópica.

Diferenças dentro de fragmentos e entre eles também podem modificar a variabilidade genética dentro ou entre populações da mesma espécie (KNOWLES, 1984). Trabalhos sobre diversidade genética em florestas têm revelado diferenças consideráveis entre populações de diferentes regiões, o que indica a importância e necessidade da realização de estudos deste tipo com espécies na sua região de origem (GILLIES et al., 1997). As diferenças dos fragmentos podem interferir de várias maneiras nas populações, nas suas interações, fluxos biológicos, sistema de reprodução e dispersão, em aspectos genéticos, entre outros (ALMEIDA et al., 2012; THOMÉ, 1995). A gravidade da situação das florestas brasileiras e a consequente possibilidade de extinção de espécies nativas evidenciam a necessidade da obtenção de informações científicas acerca destas florestas (SCHAAF et al., 2006).

As plantas possuem mecanismos como autoincompatibilidade ou sistema sexual do tipo dioica que evitam a autofecundação. No entanto, o risco de endogamia torna-se maior quando populações são reduzidas e a dispersão de pólen e sementes torna-se restrita (ELLSTRAND; ELLAN, 1993). Consequentemente pode ocorrer perda do vigor decorrente de endogamia (depressão endogâmica) e diminuição da variabilidade genética, expondo as espécies a um potencial risco de extinção (LOVELESS; HAMRICK, 1984; ALMEIDA et al., 2012).

Em espécies arbóreas neotropicais, entre as consequências da fragmentação estão o aumento de doenças e de infestações por pragas devido à diminuição da variabilidade (LOWE et al., 2005). Outro resultado da fragmentação pode ser a intensificação ou aceleração dos efeitos da deriva genética, à medida que as populações diminuem de tamanho e tornam-se isoladas. Entre as várias consequências evolutivas da deriva genética destaca-se a perda da variação genética dentro das populações, pois pode reduzir a aptidão evolutiva das populações isoladas (SEOANE et al., 2000) e levá-las a um possível risco de extinção (VAN TREUREN, 1993).

Para uma gestão de sucesso de espécies arbóreas nativas, é necessário primeiramente conhecer de maneira mais ampla possível tais espécies, quais suas composições genéticas, como elas estão organizadas (estruturadas) em suas populações e se esta organização é uma característica natural ou é resultado de ação antrópica (GALETTI, 2007). Tais informações podem ainda fornecer uma perspectiva histórica das mudanças evolutivas, auxiliando a prever como as populações responderão a eventos futuros (WALLACE, 2002). A obtenção de informações a partir de marcadores moleculares baseados em polimorfismos de DNA tem se mostrado uma forma eficiente de gerar dados sobre a variabilidade genética de populações naturais (CIAMPI, 1999; FERREIRA-RAMOS, 2008).

#### **1.4. Diversidade genética com auxílio de marcadores**

O cenário de fragmentação florestal do Brasil torna clara a necessidade de estudos acerca dos recursos genéticos de seus habitats restantes, no sentido de preservá-los e/ou recuperá-los para que funcionem como banco genético e refúgio para fauna e flora (ALMEIDA et al., 2012). Portanto, faz-se urgente e necessária a obtenção de informações sobre a variabilidade genética presente nas populações naturais. Tais dados possibilitarão análises e previsões sobre a diversidade e sua manutenção, bem como acerca das forças evolutivas envolvidas em atuação nestas populações (CIAMPI, 1999).

Entre as maneiras disponíveis de obter tais informações sobre a diversidade genética das populações naturais, está o uso de marcadores moleculares, em especial aqueles que permitem detectar polimorfismo diretamente no DNA. Diversas técnicas moleculares foram desenvolvidas com tal propósito, permitindo, entre outras possibilidades, a obtenção de marcadores distribuídos por todo o genoma. Por marcador molecular define-se todo e qualquer segmento específico do DNA, esteja em regiões expressas ou não, que diferencie dois ou mais indivíduos (MILACH, 1998).

Os marcadores moleculares podem ser classificados de acordo com sua herança como dominantes ou codominantes. Os marcadores codominantes permitem a distinção dos diferentes alelos de determinado loco e de indivíduos homocigotos e heterocigotos, o que torna tais marcadores mais informativos neste aspecto (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; FERREIRA-RAMOS, 2008).

A possibilidade de obter informações diretamente no DNA e a neutralidade fenotípica que os marcadores moleculares do DNA apresentam reforçam o seu emprego em análises de variabilidade genética (PARKER et al., 1998). No entanto, nenhuma técnica ou marcador é universalmente ideal, todas possuem pontos fortes e fracos (MUELLER;

WOLFENBARGER, 1999). Dentre os marcadores moleculares mais utilizados para estudos genéticos temos os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) também conhecidos como microssatélites e os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

### **1.5. Marcadores moleculares SSR ou microssatélites**

As regiões SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou microssatélites são constituídas por sequências curtas de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em *tandem*, em número variável, com alta abundância e distribuição no genoma (CHARLESWORTH et al., 1995; GUPTA et al., 1996). Os *primers* SSR são desenhados a partir das sequências que flanqueiam as regiões SSR. Cada região microssatélite constitui um loco específico e os diferentes tamanhos de fragmentos (bandas) amplificados constituem os diferentes alelos deste loco.

Em número e tamanho variável no genoma das plantas, as regiões SSR apresentam uma alta taxa de mutação por geração, apresentando-se, devido a esta característica, como a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponíveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; EISEN, 1999). O polimorfismo alélico que ocorre em um loco SSR geralmente é devido a alterações no número de repetições das sequências de nucleotídeos (BUSO et al., 2003). Acredita-se que tais mudanças nas sequências podem ser devidas a *crossing-over* desigual ou a deslize (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA (EISEN, 1999).

Entre os marcadores moleculares disponíveis, os SSRs são os que mais se aproximam do marcador ideal para estudos de genética de populações (RAFALSKI et al., 1996). Estes marcadores também são uma ferramenta útil para estudos ecológicos, conservacionistas e genéticos com populações naturais (EISEN, 1999; CHASE et al., 1996).

Grande parte das regiões SSR não estão localizadas em genes ou em éxons, o que está relacionado com a sua alta frequência por todo o genoma (ENGEL et al., 1996). Os marcadores SSR possuem ainda outras características desejáveis como multialelismo, fácil detecção de produtos via PCR, alta reprodutibilidade e codominância (CHASE et al., 1996; DAYANANDAN et al., 1997) o que faz deste marcador um dos mais indicados especialmente em trabalhos com espécies arbóreas que geralmente são altamente heterozigóticas, conforme vem sendo demonstrado tanto para espécies tropicais (BRONDANI et al., 2003) quanto para temperadas (JONES et al., 2002).

Apesar de todas as qualidades dos marcadores SSR, sua utilização é limitada as espécies para as quais já foram desenvolvidos *primer* para os locos SSR. Para o isolamento das regiões e desenho dos *primers* SSR é necessária a construção de bibliotecas genômicas,

clonagens e sequenciamentos, o que por sua vez demanda alto custo e trabalho (ZUCCHI et al., 2003). Este alto custo, inviabiliza o desenvolvimento em espécies sem grande importância comercial como espécies arbóreas nativas que incluem *C. xanthocarpa* Berg.

Porém, estudos vêm demonstrando a possibilidade da transferência de *primers* entre espécies de plantas relacionadas. A capacidade de transferir e utilizar os mesmos *primers* em espécies diferentes vai depender do quanto as sequências que flanqueiam as regiões SSR em questão mantiveram-se preservadas durante a evolução (ZUCCHI et al., 2003). Tem sido demonstrado que há uma maior probabilidade de partilha de *primers* entre espécies estreitamente relacionadas (DA SILVA et al., 2011). Contudo, transferências bem sucedidas entre espécies mais distantes também tem sido realizadas (FERREIRA-RAMOS, 2008; ZUCCHI et al., 2003).

Com espécies da família Myrtaceae, a qual pertence *C. xanthocarpa*, foram desenvolvidos marcadores microssatélites para *Eucalyptus* ssp. por Brondani e colaboradores (1998), que foram transferidos com sucesso para várias outras espécies e gêneros da família. Rossetto e colaboradores (1999) também desenvolveram marcadores microssatélites para *Melaleuca alternifolia* que foram transferidos com sucesso para outras espécies e gêneros da família Myrtaceae (FERREIRA-RAMOS, 2008).

## 1.6. Marcadores ISSR

Para contornar a problemática do alto custo e trabalho envolvidos no desenvolvimento dos marcadores SSR e devido à necessidade de explorar tais regiões (SSR) sem precisar de sequenciamento do DNA, foram desenvolvidos os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

Os marcadores ISSR são complementares as regiões SSR e baseiam-se na amplificação de sequências encontradas entre regiões SSR. A técnica dos marcadores ISSR é simples, eficiente e barata (MILACH, 1998; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; EISEN, 1999).

Os produtos de amplificação dos marcadores ISSR apresentam tamanho entre 200 e 2000 pares de bases, facilitando as suas análises em géis de Agarose ou Poliacrilamida (BORNET; BRANCHARD, 2001; REDDY *et al.*, 2002). Os marcadores ISSR apresentam ainda alta reprodutibilidade, quando comparados com outros marcadores inespecíficos baseados em PCR como, por exemplo, o RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) (WOLFE; LISTON, 1998).

Os marcadores ISSR tem se mostrado úteis para estimar a diversidade genética

intraespecífica e interespecífica com inúmeras espécies (BALASARAVANAN et al., 2005; NYBOM, 2004; BRANDÃO, 2008). Devido à sua abundância e dispersão no genoma, têm sido muito empregados para estudar relações entre duas populações estreitamente relacionadas (HUANG; SUN, 2000; DESHPANDE et al., 2001; LIMA et al., 2011). Os ISSR combinam a facilidade dos marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) com a robustez dos marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) e SSR, sendo assim recomendados para trabalhos que requerem confiabilidade sem alto custo para as análises (BUSO et al., 2003).

### **1.7. *Campomanesia xanthocarpa* Berg.**

A *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Figura 3), popularmente conhecida como guaviroveira, pertence à família Myrtaceae. Vários trabalhos têm relacionado a família entre as mais representativas nas diferentes formações florestais do Brasil, em especial na Floresta Ombrófila Mista, no sul do Brasil (ROMAGNOLO, 2003).

Entre as principais características importantes que a família Myrtaceae apresenta, destaca-se seu valor como apícola, ornamental, madeireiro, medicinal, além da produção de frutos comestíveis, muito apreciados por várias espécies de animais, o que torna Myrtaceae uma família indispensável para recuperação de áreas degradadas (POTT; POTT, 1994).

A guaviroveira é uma planta arbórea que pode atingir 25m de altura (MARQUES, 2007). É considerada uma planta mesófito até heliófito e seletiva higrófito (BARROSO et al. 1999). O sistema sexual da guaviroveira é monóico e a dispersão dos frutos e sementes é zoocórica. Dentre os vários animais envolvidos podem ser citados o lagarto-teiú (*Tupinamba sp.*) e o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) (CARVALHO, 2006).

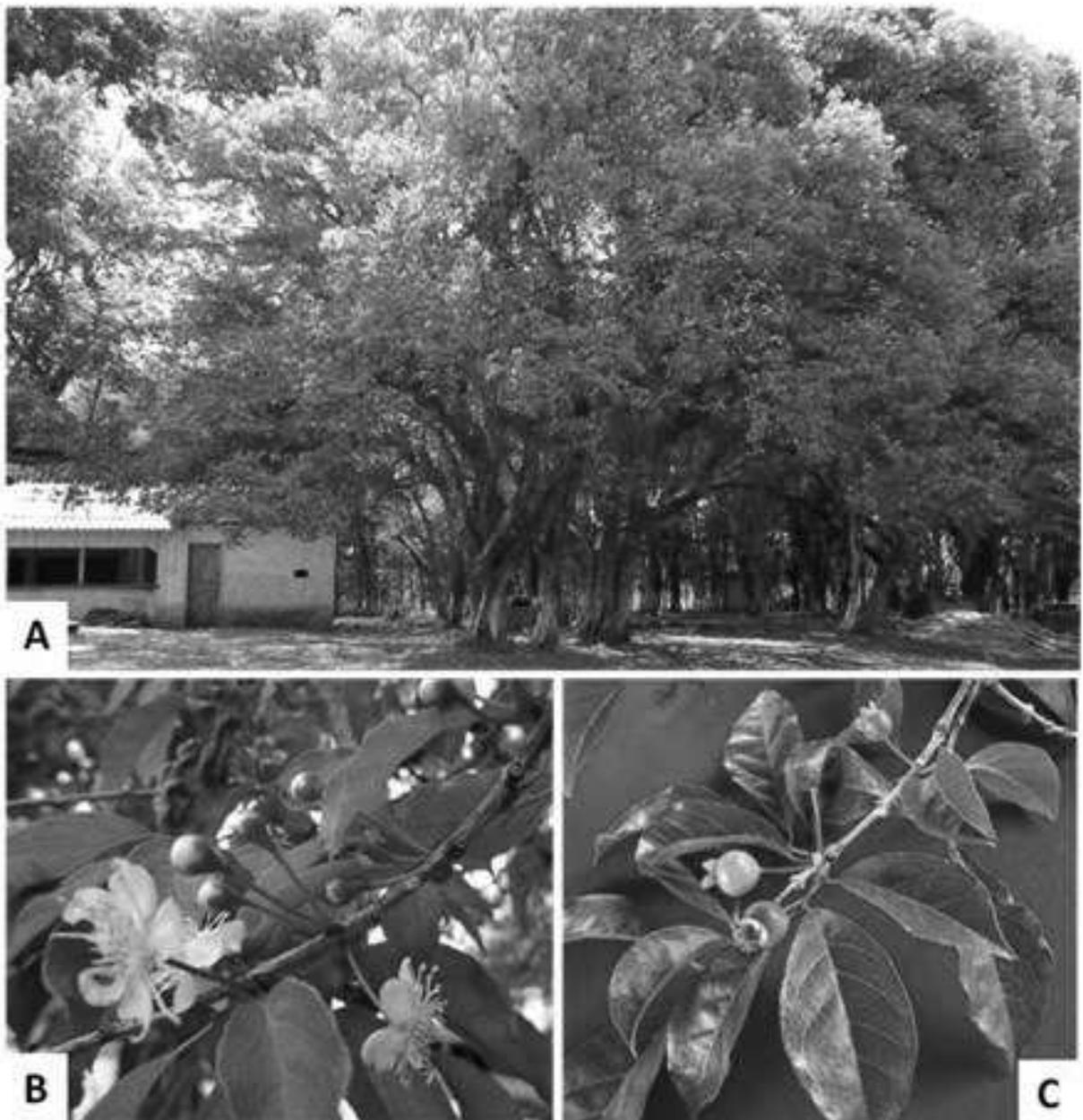
A guaviroveira ocorre principalmente entre os estados brasileiros de Goiás e Rio Grande do Sul. *C. xanthocarpa* Berg. é uma espécie secundária inicial, tardia ou clímax tolerante à sombra. A espécie ocorre em vários biomas da Mata Atlântica e também no Cerrado, podendo ocorrer isoladamente bem e sendo abundante em solos úmidos e compactos, onde forma uma parte do estrato intermediário no interior dos pinhais (CARVALHO, 2006).

Frutos, folhas e cascas da guaviroveira são empregados para tratar catarros, diarreia e disenteria, colesterol, também é utilizada no combate à gripe, contra câimbras, como anti-hemorragicas e vermífugas, principalmente pelos indígenas do sul do Brasil (CARVALHO, 2006). A espécie é uma das que apresenta maior deposição de serapilheira e macronutrientes da FOM, caracterizando-se como espécie decídua e de grande importância na estrutura de tal

Floresta (CARVALHO, 2006).

Os frutos da guaviroveira possuem polpa adocicada carnosa (ROMAGNOLO, 2003), são saborosos, ricos em sais minerais e vitaminas, em especial vitamina C, sendo consumidos ao natural ou em licores, sucos, doces e sorvetes e são o alimento preferido de várias espécies de pássaros e animais silvestres (VALLILO et al., 2008; CARVALHO, 2006; BACKES; IRGANG, 2002) .

É também uma arbórea indicada para recuperação de áreas degradadas, com significativa contribuição na composição da mata ciliar. A guaviroveira apresenta adaptabilidade a várias condições edafoclimáticas das regiões brasileiras, demonstrando o potencial da guaviroveira na fruticultura do país (CARVALHO, 2006). As características desta arbórea tem despertado o interesse das indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. No entanto, apesar da importância ecológica da espécie, do contexto de fragmentação e redução florestal do ambiente em que a espécie está inserida e do seu potencial para exploração comercial, estudos genéticos com a espécie não foram encontrados na literatura.



**Figura 3.** Características da espécie em estudo *Campomanesia xanthocarpa* Berg. a) Árvore adulta; b) Folhas e flores; c) Folhas e frutos. Fotos: Lucas Fernando da Silva e Wagner André Fagundes.

## **2. OBJETIVOS**

### **Geral:**

Analisar a diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa* Berg. do Sul do Brasil utilizando marcadores moleculares.

### **Específicos:**

1. Obter informações acerca da variabilidade genética intra e interpopulacional utilizando marcadores moleculares ISSR;
2. Inferir a partir dos dados gerados pelos marcadores ISSR se a fragmentação florestal tem efeito sobre a variabilidade genética das populações de *C. xanthocarpa* em estudo;
3. Testar a transferibilidade de marcadores moleculares SSR desenvolvidos na família Myrtaceae para *C. xanthocarpa*;
4. Obter informações acerca da variabilidade genética intra e interpopulacional por meio de marcadores moleculares SSR;
5. Inferir a partir dos dados gerados pelos marcadores ISSR se a fragmentação florestal tem efeito sobre a variabilidade genética das populações de *C. xanthocarpa* em estudo;
6. Comparar os dados obtidos com os marcadores ISSR e SSR.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS E RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A metodologia e os resultados e discussão desta dissertação serão apresentados em dois capítulos na forma de artigos científicos, sendo cada capítulo escrito nas normas da revista na qual será submetido, conforme segue:

#### **Capítulo 1:**

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Campomanesia xanthocarpa* Berg. ORIUNDAS DE FRAGMENTOS DA MATA ATLÂNTICA

Escrito nas normas da revista **Genetics and Molecular Research** ISSN 1676-5680 (JCR 1.184)

#### **Capítulo 2:**

TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES SSR DA FAMÍLIA MYRTACEAE PARA *Campomanesia xanthocarpa* Berg. E UTILIZAÇÃO EM ESTUDOS DE ESTRUTURA POPULACIONAL

Escrito nas normas da revista **Tree Genetics & Genomics** ISSN 1614-2942 (JCR 2.335)

# **CAPÍTULO 1**

## **DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Campomanesia xanthocarpa* Berg. ORIUNDAS DE FRAGMENTOS DA MATA ATLÂNTICA**

**Lucas Fernando da Silva, Wagner André Fagundes, Luciano Farinha Watzlawick e  
Paulo Roberto Da Silva**

## Diversidade genética de populações de *Campomanesia xanthocarpa* oriundas de fragmentos da Mata Atlântica

L.F. da Silva<sup>1</sup>, W.A. Fagundes<sup>3</sup>, L.F. Watzlawick<sup>2</sup> e P.R. da Silva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brasil

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

**RESUMO.** A fragmentação florestal é uma realidade presente em todos os biomas florestais do mundo e entre estes está a Mata Atlântica. A espécie *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae) compartilha inúmeras características com a maioria das espécies arbóreas da Mata Atlântica, portanto estudos genéticos como este podem nortear trabalhos com tais espécies. Assim, neste trabalho foram obtidos dados genético-populacionais, utilizando marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), de três populações de *C. xanthocarpa* Berg., uma isolada (A) e duas interligadas (B e C), a fim de verificar o efeito do isolamento na espécie. Para as análises moleculares amostras de DNA de 20 árvores de cada população foram analisadas utilizando 12 *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Seis *primers* apresentaram amplificação de qualidade gerando 64 locos polimórficos. A similaridade média baseada no coeficiente de Jaccard foi de 42,1% indicando alta diversidade entre as populações. O dendrograma feito pelo método UPGMA, baseado na similaridade genética entre os indivíduos formou três grupos, sendo cada grupo constituído exclusivamente pelos indivíduos de cada uma das populações. O dendrograma baseado nas populações e a distribuição gráfica dos indivíduos mostrou-se semelhante ao dendrograma dos indivíduos, indicando robustez nas análises e comprovando a estruturação das populações. Os valores de  $F_{st}$  (0,33) e  $G_{st}$  (0,26) indicam alto nível de diferenciação genética entre as populações. Os valores elevados dos índices de diversidade gênética de Nei ( $H=0,28$ ) e índice de informação de Shannon-Weaver ( $I=0,42$ ), somados ao alto polimorfismo encontrado (84,37%) mostram alta diversidade nas populações. O Número estimado de alelos ( $N_a=1,84$ ), acima do número efetivo ( $N_e=1,47$ ) mostrou-se suficiente para manter a atual heterozigosidade. Os resultados obtidos evidencia alta variabilidade e a estruturação genética entre as populações. A estruturação populacional observada pode ser devido ao seu isolamento geográfico condicionado pela fragmentação florestal.

**Palavras-chave:** Guaviroveira; Fragmentação de habitat, Genética de populações; Conservação; Variabilidade genética.

## INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica, formada por vários ecossistemas, configura-se num mosaico de diferentes composições e organizações de fauna e flora (Brasil, 2012). A floresta está entre as maiores neotropicais do mundo em tamanho e riqueza de espécies, com alto endemismo. Também está entre as mais ameaçadas e prioritárias do mundo, em termos de conservação (Zipparro et al., 2005). O contexto atual em que a Mata Atlântica encontra-se é de redução e fragmentação de sua área e recursos, restando apenas cerca de 7% de sua área preservada em remanescentes florestais (IBAMA, 2012).

Uma das regiões fitoecológicas da Mata Atlântica, localizada na região Sul do Brasil, é a Floresta Ombrófila Mista (FOM). A FOM caracteriza-se pela presença de *Araucária angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Klein, 1960). Esta floresta é formada por fragmentos que variam acerca dos arranjos de espécies, tamanho, forma, número, estágios de sucessão, entre outros aspectos. A área da FOM foi extremamente reduzida restando atualmente apenas aproximadamente 1 a 2% de sua cobertura original (Thomé, 1995; Koch & Corrêa, 2002).

A fragmentação florestal é citada como um dos processos com consequências mais significativamente negativas sobre o meio ambiente (Almeida et al., 2012). Com a redução e fragmentação de ecossistemas naturais, ocorre o isolamento de indivíduos criando diferentes subpopulações (Lowe et al., 2005). Os fragmentos florestais formados podem apresentar características próprias e interferir de diferentes maneiras nas populações (Almeida et al., 2012). É a partir destas novas subpopulações que a evolução adaptativa age acarretando mudanças nas frequências alélicas (Hartl & Clark, 1997), podendo acelerar e intensificar os resultados da deriva genética, aumentar a endogamia e até levar a extinção (Lowe et al., 2005).

Entre as espécies relevantes que ocorrem frequentemente em associações com *A. angustifolia* está a *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (guaviroveira) (Reitz & Klein, 1966). A *C. xanthocarpa* (guaviroveira), pertencente à família Myrtaceae (Romagnolo, 2003) é uma planta arbórea frutífera. Os saborosos frutos da guaviroveira são consumidos por várias espécies de animais e pelos humanos, bem como são utilizados na produção de sucos, doces, licores e sorvetes (Vallilo et al., 2008). A presença de sais minerais, vitamina C em grande quantidade e óleos essenciais nos frutos tem despertado o uso da espécie na indústria farmacêutica e cosmética (Romagnolo, 2003). Apesar da importância ecológica e do potencial comercial não há estudos genéticos com a espécie.

Diante da clara necessidade da conservação dos fragmentos restantes da FOM, é fundamental conhecê-los de maneira ampla para determinar ações e desenvolver estratégias adequadas para seu manejo e recuperação e/ou manutenção (Kageyama, 1998). Diversas técnicas moleculares foram desenvolvidas recentemente para detecção de variabilidade genética, algumas permitem acessá-las diretamente nas sequências de DNA utilizando-se de marcadores moleculares. Os marcadores possibilitam a obtenção de dados sobre um grande número de indivíduos, populações e espécies em um curto período de tempo (Ciampi, 1999). Tais características, somadas ao fato de apresentarem neutralidade fenotípica e multialelismo reforçam a viabilidade de sua utilização (Milach, 1998; Parker et al., 1998).

Os marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) foram desenvolvidos devido à necessidade de explorar regiões SSR que são altamente variáveis sem necessitar conhecimento prévio do genoma. A técnica dos marcadores ISSR é simples, eficiente e barata combinam a facilidade do RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) com a robustez dos marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeat*) (Buso et al., 2003). Apresentam ainda alta reprodutividade (Wolfe & Liston, 1998) e têm se mostrado úteis para estimar a diversidade genética intraespecífica e interespecífica de inúmeras espécies, bem como eficientes em análises de relações genéticas entre populações (Huang & Sun, 2000; Balasaravanan et al., 2005; Nybom, 2004; Brandão, 2008).

Considerando que *C. xanthocarpa* é uma espécie nativa arbórea de fecundação cruzada, com alta importância ecológica e potencial comercial, estudos genéticos nesta espécie podem fornecer informações importantes para conservação, manejo e exploração dos fragmentos florestais de forma eficaz. Assim, neste trabalho foram realizados estudos genéticos moleculares utilizando marcadores ISSR em três populações de *C. xanthocarpa*, coletadas em fragmentos da Mata Atlântica do sul do Brasil, visando verificar se há relação entre a situação genética atual das populações e a fragmentação florestal.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Áreas de estudo e material biológico**

Foram avaliadas três populações de *C. xanthocarpa* oriundas de três fragmentos de Floresta Ombrófila Mista, aqui denominados fragmentos A, B e C (Figura 1). O fragmento A, do qual foi coletada a população A (25°22'18.80"S, 51°30'38.95"W), é um fragmento com vegetação isolada por áreas agrícolas. Os fragmentos B, de onde foi coletada a população B

(25°19'21.75"S, 51°17'07.12"W) e o fragmento C, de onde foi coletada a população C (25°7'57.72"S, 51°23'29.37"W), encontram-se numa região que é contínua com uma área de preservação ambiental, estando assim conectados a outros remanescentes florestais (Figura 1). A distância entre as populações A e B, A e C, B e C é de aproximadamente 30, 27 e 20 km, respectivamente.

Para as análises moleculares foram coletadas de cada população de *C. xanthocarpa* folhas jovens de 20 árvores adultas, da mesma geração. As amostras de cada região foram identificadas, embaladas em papel alumínio, armazenadas em nitrogênio líquido até a extração do DNA. Para confirmação da identificação dos exemplares, foram encaminhadas, de cada população, exsiccatas a um especialista em Myrtaceae que confirmou se tratar de exemplares de *C. xanthocarpa*.

### **Extração do DNA, PCR e eletroforese**

A extração do DNA foi realizada pelo método CTAB com adição de Polietilenoglicol (PEG) conforme proposto por Sharma e colaboradores (2000). Para as análises moleculares foram testados 12 *Primers* ISSR (Tabela 1). As reações de amplificação via PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram conduzidas em um volume final de 12,5 µL contendo: 25 ng de DNA; tampão para PCR 10X; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5 mM dNTP; 10 mM de *primer*; 1 U de Taq-polimerase. As reações de amplificação foram realizadas com a seguinte programação no termociclador: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45s, 45s a 50-55°C (variando de acordo com cada *primer* - Tabela 1), 90s a 72°C e por fim 5 minutos a 72°C para extensão final dos fragmentos.

Os produtos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1,8%, visualizados por coloração com Brometo de Etídeo sobre luz ultravioleta. Foram considerados polimórficos os locos nos quais a frequência foi maior que 0,5% e menor que 95%. Somente os *primers* que apresentaram produtos de amplificação com bom padrão de resolução foram considerados.

### **Análise estatística**

Os indivíduos foram genotipados de acordo com a presença (1) e ausência (0) dos fragmentos e uma matriz binária foi construída a partir da leitura de todos os fragmentos. A porcentagem de polimorfismo de cada *primer* ISSR foi calculada pela contagem direta dos fragmentos amplificados.

A similaridade genética média entre os indivíduos foi estimada com o programa NTSYS 2.2 (Rohlf, 2000) utilizando o coeficiente de Jaccard. O dendrograma de similaridade genética entre os 60 indivíduos foi construído pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). O dendrograma, considerando as populações, foi desenhado também pelo método UPGMA, no entanto, baseado na distância genética de Nei (1978)

A partição da variação genética e a diferenciação genética entre as populações ( $F_{st}$ ) foram estimados por análise de variância molecular (AMOVA) com o programa ARLEQUIN 3.1 (Schneider et al., 2000). Também foram estimados: o número médio de alelos observados ( $N_a$ ) e o número efetivo de alelos ( $N_e$ ), percentual de locos polimórficos (P), diversidade genética ( $H_e$ ) de Nei (1973) e de Shannon-Weaver ( $H_o$ ), diferenciação genética entre as populações ( $G_{st}$ ), presença de locos exclusivos e suas frequências, pelo programa PopGene 3.12 (Yeh et al., 2000).

O programa PopGene também foi utilizado para construir o dendrograma baseado na distância genética de Nei (1978) pelo método UPGMA. Por fim, foi feita distribuição gráfica tri-dimensional, baseada no relacionamento genético entre os indivíduos, utilizando o programa FAMD (Schlüter e Harris, 2006).

## RESULTADOS

Dos 12 *primers* testados seis apresentaram produtos de amplificação de qualidade (Figura 2). Estes seis *primers* geraram 64 locos (fragmentos), apresentando uma média de 10,6 locos por *primer*, dos quais 54 caracterizaram-se como polimórficos, resultando em 84,38% de polimorfismo (Tabela 2). O número de locos amplificados com cada *primer* variou de sete (*Primer* 810) a 13 (*Primers* 807 e 836) (Tabela 2). O menor polimorfismo (71,43%) foi encontrado com o *primer* 810. Os *primers* 873 e 878 apresentaram-se 100% polimórficos (Tabela 2). Seis locos exclusivos foram encontrados na população B, dois com cada um dos *primers*: 810; 836 e 873. Estes locos exclusivos apresentaram-se em baixa frequência.

A similaridade média entre as populações foi de 42,2%, variando de 11% a 80% entre os indivíduos. O dendrograma, baseado no coeficiente de Jaccard, construído método UPGMA considerando os indivíduos formou 3 grupos, sendo cada um composto somente por indivíduos de uma única população (Figura 3). O dendrograma baseado na distância de Nei (1978), considerando as populações, mostrou-se semelhante ao baseado nos indivíduos (Figura 5).

O número médio de alelos observados estimado ( $N_a=1,84$ ) foi maior que o número

efetivo de alelos ( $N_e=1,47$ ) entre as populações (Tabela 03). A diversidade genética de Nei (1973) (H) apresentou valores próximos dentro das populações (0,20) e valor mais alto entre elas (0,28). O índice de informação de Shannon Weaver ( $H_o$ ) apresentou valores próximos dentro das populações (0,28 a 0,33) e valor mais alto entre elas (0,42) (Tabela 03).

Os resultados de Análise de Variância Molecular (AMOVA) encontram-se na tabela 3. A maior parte da variação genética foi encontrada dentro das populações (67%), no entanto alta variação foi encontrada entre elas ( $F_{st}=0,33$ ). Os valores foram significativos, com probabilidades calculadas por 1.000 permutações ao acaso ( $P < 0,001$ ). O índice  $G_{st}$ , que mostra variação genética entre as populações mostrou valor alto ( $G_{st}=0,26$ ).

## **DISCUSSÃO**

A variabilidade genética está diretamente relacionada com a sobrevivência e adaptação da espécie (Rao & Hodgkin, 2002). O atual contexto de fragmentação e redução das florestas vem ocasionado a deterioração do patrimônio genético das populações naturais, pelo isolamento de populações. Em espécies de plantas nativas, a fragmentação populacional pode ocasionar mudanças na composição genética das populações pela diminuição ou ausência de fluxo de genes entre seus indivíduos, aumentando a endogamia e acelerando os efeitos da deriva gênica, entre outras consequências (Ballal et al., 1994). Os resultados obtidos em nosso trabalho e discutidos a seguir mostra que esta situação pode estar acontecendo com a espécie *C. xanthocarpa* nos fragmentos de Mata Atlântica.

### **Polimorfismo e locos exclusivos**

A porcentagem de locos polimórficos tem sido utilizada como medida de diversidade genética em populações naturais (Lacerda et al, 2001; Ge & Sun, 2001). Pometti e colaboradores (2011), em estudo com populações de *Acacia cavens* (Fabaceae), espécie nativa da América do Sul, utilizando marcadores AFLP, encontraram uma porcentagem de locos polimórficos de 99,1%. A porcentagem de locos polimórficos encontrada neste trabalho foi de 84,38%, sendo considerado alto e conseqüentemente, evidenciando alta variabilidade na espécie.

A presença de seis locos exclusivos encontrados na população B indica maior riqueza do patrimônio genético desta população, em relação as demais, bem como remetem a estruturação entre as populações. Os locos exclusivos apresentaram-se em baixa frequência, estando mais susceptível a serem perdidos.

A equidade das frequências dos locos está relacionada à variabilidade genética (fixação e perda de locos) das populações e as suas respostas a perturbações e eventos de gargalo genético. Tais informações podem ser relevantes na determinação de áreas de preservação ou para construção de bancos de germoplasma. Comparando os resultados obtidos em *C. xanthocarpa* aos disponíveis na literatura podemos afirmar que há uma alta diversidade genética dentro das populações aqui estudadas, bem como entre elas.

### **Similaridade genética entre as populações**

A similaridade média encontrada foi de 42,17% evidenciando alta diversidade genética nas populações de *C. xanthocarpa* aqui estudadas. Em estudo de caracterização molecular de *Spondias monbin* L. (Anacardiaceae), espécie arbórea frutífera da América tropical, utilizando marcadores RAPD, Lima e colaboradores (2011), obtiveram uma similaridade média de 68,8%, valor que indica, segundo os autores, que há variabilidade genética nos acessos analisados, oriundos de populações e naturais e de germoplasma.

Em estudo com seis espécies do gênero *Eucalyptus*, foi encontrada similaridade genética média de 90% entre as diferentes espécies (Balasaravanan et al., 2005). Resultado semelhante, com média de 90% de similaridade genética foi observado em outro estudo com populações de *E. globulus* (Nesbitt et al. 1995). Embora o eucalipto pertença à mesma família (Myrtaceae) que a espécie alvo deste trabalho, por se tratar de gênero no qual é intenso o trabalho de melhoramento, a alta similaridade encontrada pelos autores é esperada.

Considerando que a similaridade é inversamente proporcional à diversidade, os resultados obtidos neste trabalho indicam alta diversidade entre as populações de *C. xanthocarpa*. Vale lembrar que se trata de espécie com reprodução alógama, portanto seria esperada diversidade alta dentro das populações e baixa entre elas.

### **Agrupamentos UPGMA e distribuição gráfica dos indivíduos**

O dendrograma de agrupamento dos 60 indivíduos das três populações de acordo com o índice de similaridade genética de Jaccard formou três grupos (Figura 3), sendo que cada grupo foi formado exclusivamente pelos indivíduos da mesma população. Este agrupamento indica que as árvores de determinada população apresentaram-se mais próximas geneticamente entre si em relação às demais árvores das outras populações.

Agrupamentos semelhantes, também separando as populações, foram observados na distribuição gráfica dos indivíduos de acordo com seus relacionamentos genéticos (Figura 4) e no dendrograma baseado nas distâncias genéticas de Nei (1978) (Figura 5). Estes

agrupamentos indicam estruturação genética entre as populações, o que provavelmente está relacionado com o isolamento das populações devido à fragmentação florestal.

### **Estruturação genética das populações**

A partição da variação genética, realizada pela AMOVA, indicou que a maior parte da variação genética é encontrada dentro das populações (66,88%) (Tabela 4). Outros estudos com espécies arbóreas de fecundação cruzada e vida longa demonstram que, assim como neste trabalho, a maior proporção da variabilidade genética encontra-se dentro das populações (Nybom, 2004; Melo Junior et al., 2004; Loveless & Hamrick, 1984).

Apesar da maior parte da variação genética estar dentro das populações, alta variação ou estruturação genética foi encontrada entre elas quando observado os valores  $F_{st}$  (33,12%) e  $G_{st}$  (26%). Vários estudos têm demonstrado baixa a moderada diferenciação genética entre populações de espécies arbóreas tropicais (Medri et al., 2011). Em estudo com espécies tropicais brasileiras, Lacerda e colaboradores (2001), encontraram 12,3% de diferenciação genética entre populações de *Plathymenia reticulata* Benth, espécie arbórea frutífera. Tendo em vista tais resultados, os resultados encontrados em nosso trabalho podem ser considerados altos.

Em revisão de estudos com espécies vegetais de fecundação cruzada, também utilizando marcadores moleculares dominantes, Nybom & Bartish (2000) obtiveram um valor médio de  $F_{st}$  de 35% e de  $G_{st}$  de 25% valores próximos aos encontrados neste trabalho. Em estudo com *Eremanthus erythropappus*, espécie arbórea brasileira com a qual há trabalhos de manejo sustentável, foi encontrado  $F_{st}$  de 12%, por Moura (2005).

De acordo com os pressupostos de Yeh (2000) e comparando os valores de  $G_{st}$  e  $F_{st}$  (índices análogos) encontrados neste trabalho com outros estudos, os valores de  $F_{st}$  e  $G_{st}$  obtidos com *C. xanthocarpa* indicam um alto nível de diferenciação genética entre as populações, assim podemos afirmar que estas populações estão estruturadas.

### **Diversidade Genética**

As principais alterações nas frequências alélicas nas populações naturais podem ser atribuídas a forças evolutivas ou a processos dispersivos. Através da estimativa das frequências alélicas foi possível estimar a diversidade genética por meio de dois índices, utilizados de maneira complementar: Shannon Weaver (1972) e Nei (1973).

O índice de diversidade genética de Nei ( $H_e$ ) permite estimar a diversidade genética de populações subdivididas a partir das frequências alélicas em termos de heterozigiosidade,

assumindo que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e os cálculos partem da raiz quadrada do homocigoto nulo, fornecendo a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações, baseando-se nas identidades e diversidades gênicas. Já o índice de diversidade de Shannon Weaver ( $H_o$ ) não se baseia na heterozigosidade da população e sim na frequência fenotípica da banda na população, dispensando desta forma assumir o equilíbrio de Hardy-Weinberg, contornando a problemática da não detecção dos genótipos heterozigotos com marcadores dominantes (Moura, 2005).

O número estimado de alelos observados ( $N_a=1,84$ ) superou o número efetivo de alelos dentro das populações ( $N_e=1,47$ ), em média, o que indica que as frequências alélicas estimadas são suficientes para manter a heterozigosidade atual das populações segundo Murawski & Bawa (1994). Lacerda e colaboradores (1999), em estudo com *M. urundeuva*, espécie arbórea comum em regiões semiáridas do Brasil, utilizando marcadores dominantes, obtiveram um número efetivo de alelos entre 1,30 e 1,60. Jaeger e colaboradores (2004) em estudo com *X. emarginata*, também utilizando marcadores dominantes, encontraram valores do número efetivo de alelos entre 1,52 e 1,79. O número estimado de alelos observados em *C. xanthocarpa* superou os valores de ambos os estudos.

A diversidade genética ou heterozigosidade média esperada estimada no presente trabalho ( $H_e=0,28$ ) (Nei, 1973) mostrou-se superior as observadas por Nybom (2004), também com espécies arbóreas (0,22). Em estudo com *Genipa americana*, Sebbenn (1997) encontrou 0,18 para  $H_e$ . Outro estudo realizado por Gandara (1996) com *Cedrella fissilis* revelou uma  $H_e$  de 0,24. Em ambos os estudos citados os valores foram inferiores aos obtidos com *C. xanthocarpa*, indicando maior diversidade genética nas populações da espécie analisadas.

Estudos com diferentes populações de *E. erythropappus*, realizados por Moura (2005) e Freitas (2001) revelaram valores de  $H_o$  que variaram de 0,49 a 0,53 e 0,38 a 0,48 respectivamente, evidenciando segundo o primeiro autor, alta diversidade genética nas populações de analisadas. O valor de  $H_o$  encontrado entre as populações de *C. xanthocarpa* analisadas neste trabalho (0,42) é próximo aos encontrados nos demais trabalhos citados.

Seis locos exclusivos foram encontrados na população B, dois com cada um dos primers: 810, 836 e 873, todos com frequência entre 0,02 a 0,2. A presença de locos exclusivos indicam maior riqueza do patrimônio genético da população B em relação as demais. Locos exclusivos podem ser importantes em decisões conservacionistas, como por exemplo no caso de escolher uma das população para servir de banco genético. A baixa frequência dos locos exclusivos remete a um possível risco de perdê-los e portanto, diminuição

da diversidade genética, o que por sua vez pode resultar em prejuízo na manutenção da espécie.

Vale considerar ainda, tendo em vista o já conhecido cenário da fragmentação das florestas no qual as populações de *C. xanthocarpa* estão inseridas, que é provável que elas não representem as populações originais, pelo menos não em sua totalidade. Possivelmente as populações são resultado do restabelecimento gradual da vegetação. Provavelmente apenas algumas amostras sobreviveram ao processo conhecido como gargalo de garrafa, intensificando o grau de perda de variabilidade genética, caso as populações permaneçam pequenas por várias gerações, contribuindo desta forma para o aumento das diferenças genéticas entre as populações.

Considerando o sistema de cruzamento alogâmico da espécie alvo deste trabalho, apesar de expressiva diversidade genética estimada nas populações de *C. xanthocarpa*, alta diferenciação genética foi encontrada entre as populações. Possivelmente tal diferenciação genética entre as populações está relacionada ao isolamento geográfico, redução ou impedimento da dispersão de pólen e semente (zoocórica), intensificação ou aceleração de processos genéticos e/ou evolutivos, condicionados pela redução e fragmentação florestal. A população B apresentou os melhores resultados (maior polimorfismo, diversidade, riqueza alélica e locos exclusivos) que as demais que apresentaram valores próximos entre si.

Os dados obtidos neste trabalho mostram que a fragmentação e redução florestal tem efeito negativo sobre o patrimônio genético das populações analisadas. Considerando que *C. xanthocarpa* é uma espécie arbórea nativa com características comuns a várias outras espécies da Mata Atlântica, os dados obtidos podem nortear estudos com tais espécies e servir para chamar a atenção para o fato que o patrimônio genético das espécies arbóreas da Mata Atlântica pode estar em risco devido à fragmentação e redução florestal, bem como servir para a determinação de gestões adequadas da espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida DJ, Faria MV, Da Silva PR (2012). Effect of forest fragmentation on microsporogenesis and pollen viability in *Eugenia uniflora*, a tree native to the Atlantic Forest. *Genet. Mol. Res.* DOI: 10.4238/2012.September.20.2.
- Balasarayanan T, Chezian P, Kamalakannan R, Ghosh M, Yasodha R, Varghese M, Gurumurthi 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.
- Ballal RS, Foré SA, Guittman SL (1994). Apparent gene flow and genetic structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. *Can. J. Bot.* 72: 1311-1315.
- Brandão, MM (2008). Diversidade Genética de *Myrcia splendens* (S.Ww.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 80f.
- Brasil. Ministério do meio ambiente (2012). Mata atlântica. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: agosto de 2012.
- Brondani C, Rangel PH, Borba TC, Brondani RP (2003). Transferability of microsatellite and sequence tagged site markers in *Oryza* species. *Hereditas* 138: 187-192.
- Buso GSC, Ciampi AY, Moretzsohn MC, Amaral ZPS, Brondani RV (2003). Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais. *Biotecnol. Ciênc. Des.* 7:46-50.
- Ciampi AY (1999). Desenvolvimento e utilização de marcadores microsatélites, AFLP e seqüenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu. 204f.
- Ge XJ and Sun M (2001). Population genetic structure of *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae) in Thailand and China. *Wetlands Ecol. Manage.* 9: 203–209.
- Hartl DL and Clark AG (1997). Principles of Population Genetics. 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 542 pp.
- Huang J and Sun SM (2000). Genetic diversity and relationship of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1050–1060.

- IBAMA, Instituto brasileiro do meio ambiente e recursos naturais renováveis (2012). Mata Atlântica. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata\\_atlantica.htm](http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm)>. Acesso em: agosto de 2012.
- Kageyama PY, Gandara FB, Souza LMI, de (1998). Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série técnica IPEF*. 12: 65-70.
- Klein RM (1960). O aspecto dinâmico do pinheiro-brasileiro. *Sellowia*. 12: 17-48.
- Koch Z and Corrêa MC (2002). Araucária: a floresta do Brasil meridional. Curitiba: Olhar Brasileiro.
- Lacerda DR, Acedo MDP, Lemos Filho JP, Lovato MB (2001). Genetic Diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Mol. Ecol.* 10: 1143-1152.
- Lima ATB, Souza VAB de, Gomes RLF, Lima PCS (2011). Molecular characterization of cajá, *Spondias mombin* (Anacardiaceae), by RAPD markers. *Gen. Mol. Res.* DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2011.November.25.1>
- Loveless MD and Hamrick JL (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CF (2005). Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95: 255-273.
- Ma X, Bai SQX, Chen SY, Zhang XQ, Li DX, Zhang CB, Yan JJ (2012). RAPD analysis of genetic diversity and population structure of *Elymus sibiricus* (Poaceae) native to the southeastern Qinghai-Tibet Plateau, China. *Genet. Mol. Res.* 11: 2708-2718.
- Medri C, Ruas EA, Ruas CF, Medri PS, Medri ME, Ruas PM (2011). Population genetic structure of the tropical tree species *Aegiphila sellowiana* (Lamiaceae). *Genet. Mol. Res.* DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2011.December.20.3>.
- Melo Junior AF de, Carvalho D de, Póvoa JSR, Bearzoli E (2004). Estrutura genética de populações naturais de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). *Sci. Forestry*. 66: 56-65.
- Milach SCK (1998). Marcadores de DNA. *Biotecnol. Ciênc. Des.* 5: 14-17.
- Mills LS and Allendorf FW (1996). The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conserv. Biol.* 10: 1509–1518.
- Moura COM (2005). Distribuição da Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish por Isoenzimas e RAPD. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Murawski DA and Bawa KS (1994). Genetic structure and mating system of *Stemonoporus*

- oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. *Am. J. Bot.* 81: 155-160.
- Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70: 3321-3323.
- Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei M (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nesbitt KA, Potts BM, Vaillancourt RE, West AK, Reid JB (1995). Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Heredity*, 74: 628-637.
- Nybom H (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13: 1143-1155.
- Nybom H and Bartish IV (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Plant Ecol. Evol. Syst.* 3: 93-114.
- Parker GD, Chalmers KJ, Rathjen AJ, Langride P (1998). Mapping loci associated with flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97: 238-245.
- Rao VR, Hodgkin T (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 68: 1-19.
- Reitz R and Klein RM (1966). *Flora Ilustrada Catarinense: Araucariaceae*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- Rohlf FJ (1997). *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Setauket, NY: Exeter Software. NTSYS-PC 2.1.
- Romagnolo MB (2003). *A família Myrtaceae na planície alagável do alto rio Paraná, estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil*. Maringá. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá. 120f.
- Schlüter PM and Harris SA (2006). Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes*; 6:569-572.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000). "Arlequin: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Sharma KK, Lavanya M, Anjaiah V (2000). A method for isolation and purification of peanut genomic DNA suitable for analytical applications. *Plant. Mol. Biol. Reporter.* 18: 393-393.
- Silva CJD (2009). *Caracterização genética de Cajazeira (Spondias mombin L.) (Anacardiaceae) por meio de marcadores moleculares*. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.

- Slatkin M (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Thomé N (1995). Ciclo da madeira: história da devastação da Floresta de Araucária e do desenvolvimento da indústria madeireira em Caçador e na região do Contestado no século XX. Caçador: Universal.
- Torggler MGF, Contel EPB, Torggler SP (1995). Isoenzimas –Variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 186p.
- Vallilo MI, Moreno PRH, Oliveire E, Lamardo LCA, Garberlotti ML (2008). Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg.-Myrtaceae. *Ciênc. Technol. Aliment.* 28: 231-237.
- Wolfe AD and Liston A (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ. [eds.], *Molecular systematics of plants II, DNA sequencing* Kluwer Academic Publishers, New York, New York, USA. 43-46.
- Wright S (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Hum. Genet.* 15: 395-420.
- Yeh FC, Yang R and Boyle TJ (2000). PopGene 3.12. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton.
- Pometti CL, Bessega CF, Vilardi JC, Saidman BO (2012). Landscape genetic structure of natural populations of *Acacia caven* in Argentina. *Tree Genet Genomes*. DOI 10.1007/s11295-012-0479-6.

**Tabela 1.** *Primers* ISSR selecionados para o estudo da diversidade genética em populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR - Brasil.

<i>Primers</i>	Sequência (5' – 3')	Ta (°C)**	Nº locos	Locos polimórficos	% polimorfismo
807	(AG) <sub>8</sub> T	52°	13	10	76,92
808	(AG) <sub>8</sub> C	50°	-	-	-
809	(AG) <sub>8</sub> G	55°	-	-	-
810	(GA) <sub>8</sub> T	50°	7	5	71,43
811	(GA) <sub>8</sub> C	53°	-	-	-
815	(CT) <sub>8</sub> G	53°	-	-	-
835	(AG) <sub>8</sub> Y*C	54°	9	7	77,77
836	(AG) <sub>8</sub> Y*A	53°	13	10	76,92
861	(ACC) <sub>6</sub>	52°	-	-	-
864	(ATG) <sub>6</sub>	50°	-	-	-
873	(GAGA) <sub>4</sub>	50°	10	10	100
878	(GGAT) <sub>4</sub>	54°	12	12	100

\* Y = pirimidina (C ou T); \*\* Ta: Temperatura de anelamento.

**Tabela 2.** Índices genéticos obtidos com os dados de seis *primers* ISSR em três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR - Brasil, utilizando o programa PopGene.

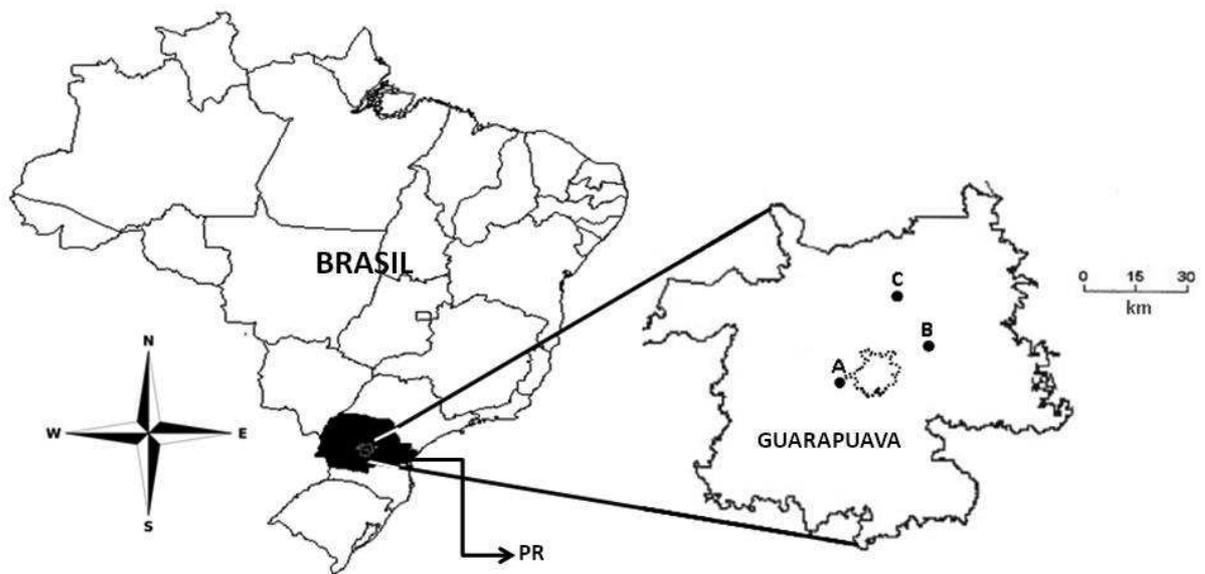
	LP	P	Na	Ne	H	I
Pop. A	38	59,38%	1,5938	1,3758	0,2148	0,3180
Pop. B	41	64,06%	1,6406	1,3688	0,2193	0,3302
Pop. C	36	56,25%	1,5625	1,3295	0,1902	0,2838
M-Pop	54	84,37%	1,8438	1,4734	0,2822	0,4266

LP: Locos polimórficos; P: Porcentagem de locos polimórficos; Na: Número de alelos; Ne: Número efetivo de alelos; H: Diversidade genética de Nei (1973); I: Índice de informação de Shannon-Weaver; M-Pop: Análises multipopulacionais.

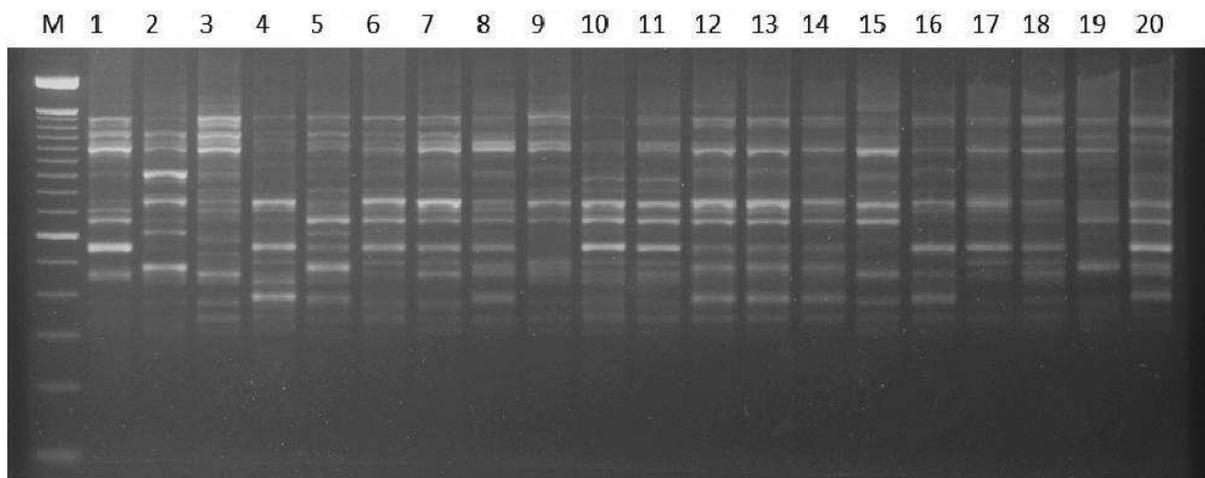
**Tabela 3.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR - Brasil.

Fonte de variação	grau de liberdade	Soma quadrados	Comp. variância	% de Variância
Entre populações	2	163,050	370239	33,12
Dentro populações	57	426,200	7477119	66,88
Total	59	589,250	1.117,958	

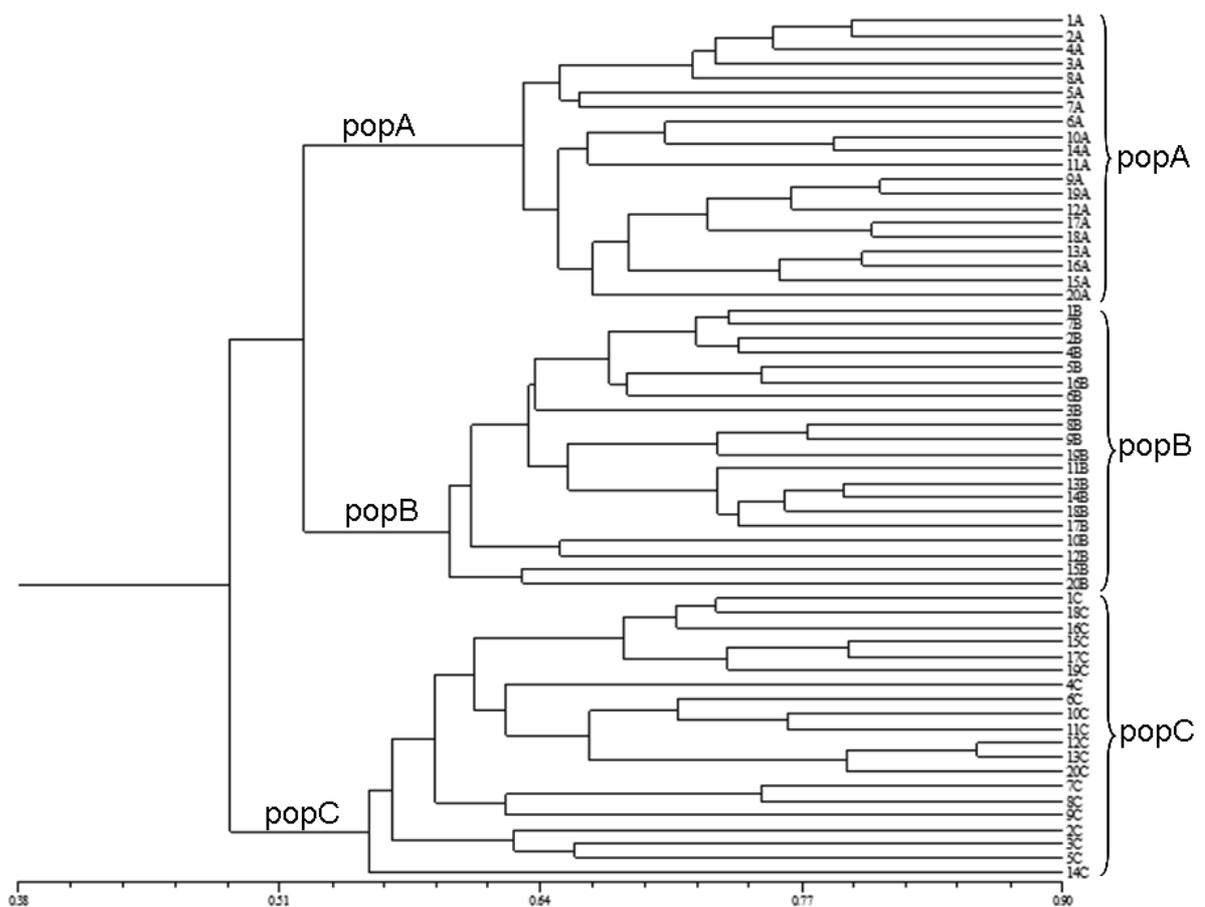
Índice de Fixação FST: 0,3311 P < 0,001



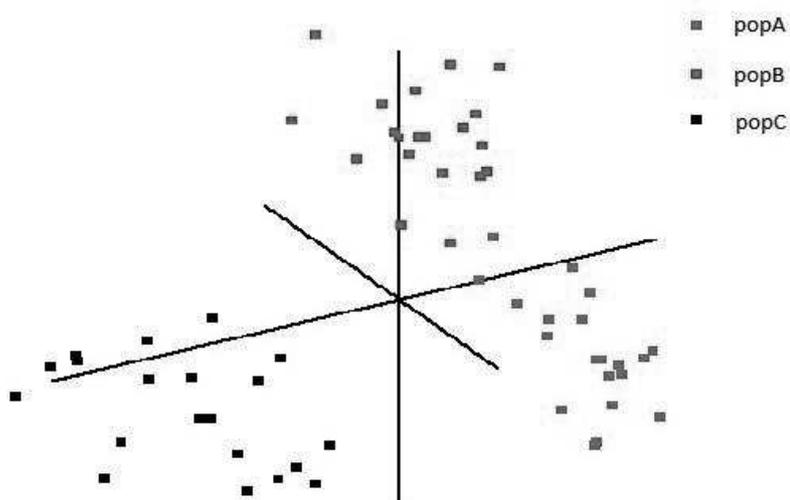
**Figura 1.** Localização das três populações de *C. xanthocarpa* Berg. estudadas neste trabalho (A, B e C). A linha pontilhada indica a área urbana do município de Guarapuava, PR - Brasil.



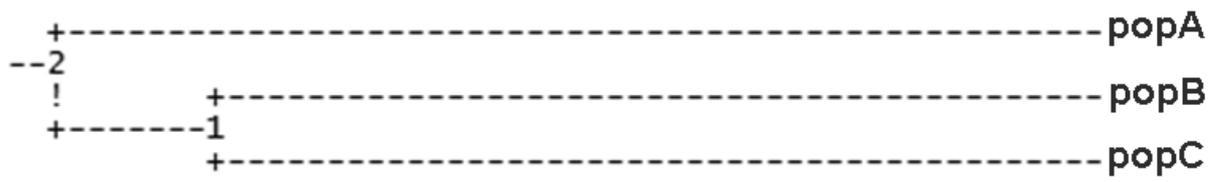
**Figura 2.** Perfil eletroforético do *primer* 807 obtido pela amplificação por PCR do DNA genômico da população A de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR – Brasil. M: Marcador de peso molecular de DNA (Ladder 100pb).



**Figura 3.** Dendrograma de agrupamento dos 60 indivíduos das três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR - Brasil, segundo o coeficiente de Jaccard e método UPGMA.



**Figura 4.** Distribuição gráfica tri-dimensional baseada no relacionamento genético entre os 60 indivíduos das três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR – Brasil.



**Figura 5.** Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de Nei (1978), construído pelo método UPGMA, entre as três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava, PR - Brasil.

## CAPÍTULO 2

TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES SSR DA FAMÍLIA MYRTACEAE PARA *Campomanesia xanthocarpa* Berg. E UTILIZAÇÃO EM ESTUDOS DE ESTRUTURA GENÉTICO-POPULACIONAL

**Lucas Fernando da Silva, Wagner André Fagundes, Luciano Farinha Watzlawick e Paulo Roberto Da Silva**

## Transferibilidade de marcadores SSR da Família Myrtaceae para *Campomanesia xanthocarpa* e utilização em estudos de estrutura genético-populacional

L.F. da Silva<sup>1</sup>, W.A. Fagundes<sup>3</sup>, L.F. Watzlawick<sup>2</sup> e P.R. da Silva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brasil

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

**RESUMO.** A fragmentação florestal é uma realidade presente em todos os biomas florestais do mundo e entre estes está a Mata Atlântica. A espécie *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae) compartilha inúmeras características com a maioria das espécies arbóreas da Mata Atlântica, portanto estudos genéticos como este podem nortear trabalhos com tais espécies. Assim, neste trabalho foram estimados aspectos genético-populacionais de três populações de *C. xanthocarpa* Berg., uma isolada (A) e duas interligadas (B e C), utilizando marcadores moleculares SSR (*Simple Sequence Repeat*), a fim de verificar o efeito do isolamento na espécie. De 21 pares de *primers* desenvolvidos na família Myrtaceae testados, 14 (66,66%) foram transferidos com sucesso para *C. xanthocarpa* e utilizados para as análises com amostras de DNA de 20 árvores de cada população. Os *primers* transferidos amplificaram 46 alelos. A similaridade média entre as populações, baseada no coeficiente de Jaccard, foi de 41%, indicando alta variabilidade entre as populações. O dendrograma considerando as populações, feito pelo método UPGMA, baseado em distância genética (Nei, 1978) mostrou que a população A é a mais afastada geneticamente das demais. O dendrograma baseado no coeficiente de Jaccard considerando indivíduos separou população A (isolada), e agrupou em um só grupo os indivíduos das populações B e C. Altos valores de *F<sub>it</sub>* (0,21) e *F<sub>st</sub>* (0,19) foram encontrados, indicando deficiência de heterozigotos e diferenciação genética entre as populações. Alta porcentagem de locos polimórficos foi encontrada (*P*=87,18%), no entanto baixo número médio de alelos amplificados por loco polimórfico foi obtido (*A<sub>p</sub>*=3,22). A heterozigosidade média observada (*H<sub>o</sub>*=0,46), apresentou valor expressivo, muito próximo da esperada (*H<sub>e</sub>*=0,47). A população B (conectada com outros fragmentos) apresentou os maiores valores de diversidade genética, já com a população A (isolada) foi observado o contrário, enquanto que valores intermediários foram encontrados com a população C. Cinco alelos exclusivos foram encontrados nas populações B (3 alelos) e C (2 alelos). Os resultados indicam que apesar de haver certa diversidade dentro das populações, está ocorrendo perda de variabilidade na população A e diferenciação genética

entre as populações, provavelmente devido ao isolamento e redução das populações, condicionados pela fragmentação florestal.

**Palavras-chave:** Guaviroveira; Fragmentação de habitat, Genética de populações; Conservação; Mata Atlântica.

## Introdução

A Mata Atlântica é formada por vários ecossistemas e configura-se num mosaico de diferentes composições e organizações de fauna e flora (Brasil 2012). Esta floresta está entre as maiores neotropicais do mundo tanto em tamanho quanto em riqueza de espécies, com alto endemismo. Também está entre as mais ameaçadas e prioritárias do mundo em termos de conservação (Zipparro et al. 2005). O contexto atual em que a Mata Atlântica encontra-se é de redução e fragmentação de sua área, restando apenas cerca de 7% de sua área preservada em remanescentes florestais (IBAMA 2012).

Uma das regiões fitoecológicas da Mata Atlântica é a Floresta Ombrófila Mista (FOM). Na região sul do Brasil tal formação caracteriza-se pela presença de *Araucária angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Klein 1960). Entre as espécies relevantes que ocorrem frequentemente em associação com *A. angustifolia* está a *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Reitz and Klein 1966). A FOM é formada por fragmentos que variam acerca dos arranjos de espécies, tamanho, forma, número, estágios de sucessão, entre outros aspectos. Sua área foi extremamente reduzida, restando atualmente apenas cerca de 1 a 2% de sua cobertura vegetal original (Thomé 1995, Koch e Corrêa 2002).

A fragmentação florestal é citada como um dos processos com consequências mais significativamente negativas sobre o meio ambiente. Com a redução e fragmentação de ecossistemas naturais, ocorre o isolamento de indivíduos criando diferentes subpopulações (Lowe et al. 2005). Os fragmentos florestais formados podem apresentar características próprias e interferir de diferentes maneiras nas populações (Almeida et al. 2012). É nestas novas subpopulações que a evolução adaptativa age acarretando mudanças nas frequências alélicas (Hartl and Clark 1997), podendo acelerar e intensificar os resultados da deriva genética, aumentar a endogamia e até levar à extinção (Lowe et al. 2005).

Diante da clara necessidade da conservação dos fragmentos restantes da Mata Atlântica, é fundamental conhecê-la de maneira ampla para determinar ações e desenvolver estratégias adequadas para seu manejo e recuperação e/ou manutenção (Kageyama 1998). Diversas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para detecção de variabilidade genética, algumas permitem acessar a informação diretamente nas sequências de DNA utilizando-se de marcadores moleculares baseados em DNA. Os marcadores moleculares possibilitam a obtenção de dados sobre um grande número de indivíduos, populações e espécies em um curto período de tempo (Ciampi 1999; Ferreira-Ramos 2008). Tais características, somadas ao fato de apresentarem neutralidade fenotípica e multialelismo reforçam a viabilidade de sua utilização (Milach 1998; Parker et al. 1998).

Dentre os marcadores moleculares mais recomendados para estudos de genética de populações estão os SSR (*Simple Sequence Repeats*) também conhecidos como microssatélites. As regiões SSR são sequências curtas de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em *tandem*, em número variável, com alta abundância e amplamente distribuídos no genoma (Charlesworth et al. 1995; Gupta et al. 1996). Os *primers* SSR são complementares às sequências que flanqueiam as regiões SSR. Cada região SSR constitui um loco específico e os diferentes tamanhos de fragmentos (bandas) amplificados constituem os alelos deste loco.

Os SSR são os marcadores moleculares que mais se aproximam do marcador ideal para estudos de genética de populações (Rafalski et al. 1996) pois são fenotipicamente neutros, codominantes, multialélicos e apresentam alta reprodutibilidade (Eisen 1999; Chase et al. 1996; Dayanandan et al. 1997). São excelentes para trabalhos com espécies arbóreas que geralmente são altamente heterozigóticas (Brondani et al. 2003; Jones et al. 2002).

Apesar das qualidades dos marcadores SSR, sua utilização é limitada com espécies arbóreas nativas, devido à escassez de informações sobre suas sequências de DNA. Para o isolamento das regiões e desenho dos *primers* SSR é necessário a construção de bibliotecas genômicas, clonagens e sequenciamentos, o que demanda alto custo e trabalho (Zucchi et al. 2003). Porém, estudos vêm demonstrando a possibilidade da transferência de *primers* entre espécies de plantas relacionadas (Da Silva et al. 2010).

Com espécies da família Myrtaceae, a qual pertence *C. xanthocarpa*, foram desenvolvidos, por exemplo, mais de 400 marcadores microssatélites para *Eucalyptus* ssp. por Brondani e colaboradores (1998), que foram transferidos com sucesso para várias outras espécies e gêneros da família. Rossetto e colaboradores (1999) também desenvolveram marcadores microssatélites para *Melaleuca alternifolia* que foram transferidos com sucesso para outras espécies e gêneros da família Myrtaceae (Ferreira-Ramos, 2008).

A *Campomanesia xanthocarpa* (Guaviroveira), pertencente à família Myrtaceae é uma planta arbórea com importância ecológica e alimentícia por possuir frutos saborosos que são consumidos por várias espécies de animais e utilizados na produção de sucos, doces e sorvetes (Vallilo et al. 2008). A presença de sais minerais, vitamina C e óleos essenciais em grande quantidade nos frutos tem despertado o uso da espécie na indústria farmacêutica e cosmética. Apesar da importância ecológica e do potencial comercial não há estudos genéticos com a espécie.

Neste trabalho foram realizados estudos genético-moleculares utilizando marcadores SSR em três populações de *C. xanthocarpa*, coletadas em fragmentos da Mata Atlântica do Sul do Brasil. Foram estimados valores de similaridade genética média dentro e entre as

populações, parâmetros de diversidade genética e polimorfismo, agrupamentos de acordo com os relacionamentos genéticos entre os indivíduos e populações, bem como índices de diferenciação genética entre as populações, visando verificar se há relação entre a situação genética atual das populações e a fragmentação florestal.

## **Material e Métodos**

### Áreas de estudo e material biológico

Neste trabalho foram avaliadas três populações de *C. xanthocarpa* oriundas de três fragmentos de Floresta Ombrófila Mista, aqui denominados fragmentos A, B e C. O fragmento A, do qual foi coletada a população A (25°22'18.80"S, 51°30'38.95"W), é um fragmento de vegetação isolada por áreas agrícolas (Figura 1). Os fragmentos B, de onde foi coletada a população B (25°19'21.75"S, 51°17'07.12"W) e o fragmento C, de onde foi coletada a população C (25°7'57.72"S, 51°23'29.37"W), encontram-se numa região que é contínua com uma área de preservação ambiental, estando assim conectados a outros remanescentes florestais. A distância entre as populações A e B, A e C, B e C é de aproximadamente 30, 27 e 20 km, respectivamente.

Para as análises moleculares foram coletadas folhas jovens de 20 árvores adultas de *C. xanthocarpa* de cada população. As amostras de cada fragmento foram identificadas, embaladas em papel alumínio, armazenadas em nitrogênio líquido até a extração do DNA. Para confirmação da identificação dos exemplares, foram encaminhadas de cada população exsiccatas a um especialista em Myrtaceae que confirmou se tratar de exemplares de *C. xanthocarpa*.

### Extração do DNA e teste de transferibilidade dos *primers* SSR heterólogos

A extração do DNA foi realizada pelo método CTAB com adição de Polietilenoglicol (PEG) conforme proposto por Sharma e colaboradores (2000). Vinte e um pares de *primers* SSR desenvolvidos em três espécies da família *Myrtaceae* foram submetidos a testes de amplificação do DNA de *C. xanthocarpa* via PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando variadas concentrações de reagentes e programações do termociclador, inicialmente com cinco amostras de cada população. Dos 21 *primers*, 13 foram desenvolvidos em *Eucalyptus spp.* por Brondani e colaboradores (1998) (Embra14, Embra26, Embra63, Embra69,

Embra85, Embra99, Embra108, Embra128, Embra143, Embra166, Embra210, Embra265 e Embra267); sete em *Eugenia uniflora* desenvolvidos por Ferreira-Ramos (2008) (Eun2, Eun5, Eun7, Eun11, Eun21, Eun22 e Eun 12) e um em *Melaleuca alterinfolia* (Scu052tt) desenvolvido por Rossetto e colaboradores (1999). Os *primers* que apresentaram bom padrão de resolução e produtos de amplificação de tamanho esperado foram selecionados para as análises nas populações de *C. xanthocarpa* (Tabela 1).

#### Análises nas populações

Para as análises moleculares foram utilizados 14 *Primers* SSR previamente selecionados (Tabela 1). As reações de amplificação via PCR foram conduzidas em volume final de 10 µL contendo: 25 ng de DNA; tampão para PCR 1X; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5 mM dNTP; 10 mM de *primer* (*forward e reverse*); 1 U de Taq-polimerase. As reações de amplificação foram realizadas com a seguinte programação no termociclador: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 49-54°C (variando de acordo com cada *primer*, Tabela 01), 90s a 72°C e por fim 5 minutos a 72°C para extensão final dos fragmentos. Os produtos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de Agarose 3%, visualizados por coloração com Brometo de Etídeo sobre luz ultravioleta. Foram considerados polimórficos os locos nos quais a frequência foi maior que 0,5% e menor que 95%.

#### Análise estatística

Após a genotipagem dos géis a similaridade genética média entre os indivíduos foi estimada utilizando o programa NTSYS 2.2 (Rohlf, 2000) utilizando o coeficiente de Jaccard e o dendrograma de similaridade entre os indivíduos foi construído pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

Com o programa GDA versão 1.1 (Lewis e Zaykin, 2000) foram estimados os seguintes índices genéticos: Tamanho amostral médio sobre todos os locos (n); Porcentagem de locos polimórficos (P); Média de alelos por loco (A) e por loco polimórfico (Ap); Heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho); Estatísticas F de Wright (1951); Dendrograma baseado em Distância genética de Nei (1978); Alelos exclusivos e suas frequências.

## Resultados

Dos 21 pares de *primers*, 14 (66,66%) amplificaram fragmentos de tamanho esperado. Os *primers* transferidos com sucesso foram: Nove desenvolvidos em *Eucalyptus spp.* (Embra14, Embra26, Embra63, Embra69, Embra85, Embra123, Embra148, Embra166 e Embra210); Quatro em *E. uniflora* (Eun5, Eun7, Eun11 e Eun121) e o par desenvolvido em *Melaleuca alternifolia* (Tabela 1). Dos 14 pares de *primers* transferidos, Embra85 foi o único monomórfico, não sendo considerado nas análises. Portanto, a porcentagem de polimorfismo obtida com os *primers* foi de 87,18%. O *primer* Eun121 apresentou polimorfismo de presença e ausência sugerindo tratar-se de um caso de alelo nulo. Os 13 locos SSR analisados apresentaram 46 alelos (Tabela 2). O número de alelos encontrados por loco variou entre dois (Embra63 e Eun121) e sete (Embra 14) (Tabela 2).

A similaridade genética média encontrada entre as populações foi de 41%. A similaridade máxima encontrada entre os indivíduos foi de 100%, enquanto que a mínima foi de 12,5%. O tamanho médio amostral obtido foi de 19,72 indivíduos/locos. A porcentagem de locos polimórficos foi de 87,2% entre as populações, variando de 76,92% (população A) a 100% (população B) dentro das populações (Tabela 2). A média de alelos por loco foi de 2,95, enquanto que o valor médio de alelos por loco polimórfico chegou a 3,22 (Tabela 2).

A maior heterozigosidade foi observada para o loco Embra14 ( $H_o=0,76$ ), valor abaixo do esperado com tal loco ( $H_e=0,82$ ) (Tabela 1), de acordo com as proporções teóricas de Hardy-Weinberg. A menor heterozigosidade foi observada para o loco Eun121 ( $H_o=0,18$ ), seguido pelo loco Embra63 ( $H_o=0,20$ ), para os quais tais valores mostraram-se de acordo ou acima do esperado, respectivamente ( $H_e=0,18$  em ambos os casos). Em média os locos apresentaram heterozigosidade observada abaixo da esperada. O loco que apresentou maior índice de fixação de alelos foi o Embra123 ( $F_{is}=0,35$ ), já o que apresentou o menor valor para tal índice foi o loco Embra69 ( $F_{is}=-0,32$ ) (Tabela 1). Em média o valor encontrado para o índice de fixação de alelos foi positivo ( $F_{is}=0,021$ ).

Dentro das populações, a menor heterozigosidade observada foi encontrada para a população A ( $H_o=0,41$ ) enquanto que a maior ( $H_o=0,51$ ) foi observada na população B. Entre as populações a heterozigosidade média observada foi de 0,46, enquanto que a heterozigosidade média esperada foi de 0,47 (Tabela 2).

Dois alelos exclusivos, com frequências entre 0,15 e 0,25, foram encontrados para o loco Embra14, na população C. Outros três alelos exclusivos, com frequências entre 0,02 e 0,12, foram encontrados na população B para os locos Embra148, Eun121 e Scutt052.

O índice de fixação intrapopulacional médio ( $F_{is}$ ) encontrado entre as populações foi

de 0,021 (IC 95%). Entre os locos, apenas dois apresentaram valores negativos. O índice de Fixação para o conjunto das populações (Fit) apresentou valor médio de 0,213 (IC 95%; -0,3888 a 0,6356). A diferenciação genética entre as populações (FST) foi de 0.195500 (IC 95%; -0.0242 a 0,6603).

Foram gerados dois dendrogramas, um comparando as populações de acordo com a distância genética de Nei (1978) e outro utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard, ambos pelo método UPGMA. O dendrograma comparando as populações aproximou as populações B e C, isolando a população A (Figura 3). O Dendrograma comparando os indivíduos manteve os indivíduos da população A em um grupo isolado, enquanto os indivíduos das populações B e C formaram um único grupo, sem distinção de populações (Figura 4).

## **Discussão**

### Transferibilidade

Dos 21 pares de *primers* testados, 14 (66.66%) apresentaram produtos de amplificação, evidenciando alta transferibilidade quando comparados com dados da literatura para família Myrtaceae. Zucchi e colaboradores (2003) testando a transferibilidade de *primers* SSR, desenvolvidos no gênero *Eucalyptus* para *Acca sellowiana*, obtiveram 44,5% de sucesso, valor que os autores consideraram alto, comparando com resultados obtidos de transferência de *primers* SSR desenvolvidos em *Eucalyptus* para *E. dysenterica* (2,8%).

Rossetto e colaboradores (2000) trabalhando com espécies da família Myrtaceae, transferiram com sucesso 35 pares de *primers* desenvolvidos em *M. alternifolia*, para outras sete espécies, sendo que 21 pares de *primers* foram transferidos entre espécies do gênero, enquanto que dois pares (Scu023tt e Scu052tt) foram transferidos com sucesso para todas as espécies avaliadas, pertencentes a quatro gêneros distintos, sugerindo que tais locos estão localizados em uma região do genoma das Myrtaceae altamente conservada. O loco Scu052tt também foi transferido com sucesso neste trabalho. Tais resultados podem ser úteis em outros estudos com a vasta e representativa família Myrtaceae, auxiliando na resolução de problemas filogenéticos e na compreensão de tal família de maneira mais ampla.

## Variabilidade genética

A similaridade genética média encontrada entre as populações (41%) apresentou-se próxima as baixas similaridades genéticas médias (35% e 37,5%) encontradas por Zucchi e colaboradores (2003) em estudo com grupos de acessos de germoplasma de *Acca selowiana*. Neste mesmo trabalho os autores concluem que, de acordo com a similaridade genética encontrada, os acessos apresentaram alta diversidade. Assim, podemos afirmar que de acordo com a similaridade observada em nosso trabalho, as populações de *C. xanthocarpa* estudadas apresentam alta diversidade genética.

O tamanho médio amostral sobre todos os locos ( $n$ ) ficou em 19,72, devido à ausência de produtos de amplificação com alguns indivíduos (representatividade), o que pode ser explicado pela presença de alelos nulos. Estudos genéticos com marcadores transferidos podem apresentar índices mais elevados de homozigotos, o que pode ser explicado pela possibilidade da ocorrência de alelos nulos, tendo em vista a grande taxa de mutação por geração das regiões microssatélites (Lehman et al., 1996). Devido aos padrões eletroforéticos observados e as altas heterozigosidades encontradas neste trabalho, o loco Eun121 parece apresentar alelo nulo, sendo o maior responsável pela redução do tamanho populacional médio em relação ao esperado, que seria 20.

Alta porcentagem média de locos polimórficos foi encontrada: 87,18%, variando de 76,9 (população A) a 100% (população B) (Tabela 2). Apesar da alta transferibilidade e porcentagem de locos polimórficos alcançadas neste trabalho, foi observado um nível relativamente baixo de alelos por loco polimórfico (média de 3,22), quando comparado aos 10,4 alelos/loco polimórfico obtidos por Zucchi e colaboradores (2003), utilizando SSR transferidos de *Eucalyptus ssp.* para *Eugenia dysenterica*. Tais diferenças nos resultados estão relacionadas a alterações nas sequências que flanqueiam as regiões microssatélites entre os gêneros *Campomanesia* e *Eugenia*.

O loco Embra14, o mais polimórfico deste trabalho (sete alelos), amplificou 22 alelos em *E. dysenterica* (Zucchi et al. 2003). Já o loco Embra63 que apresentou o menor polimorfismo (dois alelos) neste trabalho, apresentou 11 alelos em trabalho com *E. Uniflora*, sendo o mais polimórfico no estudo realizado por Ferreira-Ramos (2008). Para o loco Embra210, 14 alelos foram encontrados em *E. uniflora* e *E. dysenterica* (Ferreira-Ramos, 2008; Zucchi et al., 2003), em contraste com os três alelos encontrados em *C. xanthocarpa*.

A Diversidade Genética ou heterozigosidade média esperada (Nei, 1973) ( $H_e=0,47$ ) mostrou-se acima da Heterozigosidade média observada nas populações de *C. xanthocarpa*,

indicando que está ocorrendo desvio das proporções teóricas de Hardy-Weinberg. Os valores encontrados aproximam-se ao obtido em trabalho com *Swietenia humilis* ( $He=0,53$ ), realizado por White et al. (1999). Alison e colaboradores (2011), trabalhando com *Gmelina arborea*, também utilizando SSR encontraram heterozigosidade média observada abaixo da esperada. Tal deficiência de heterozigotos foi observada com a maioria dos locos utilizados no presente trabalho, com exceção de dois locos (Embra63 e Embra69) (Tabela 1).

A verificação de cinco alelos exclusivos para as populações B (três alelos exclusivos) e C (dois alelos exclusivos) reforçam a riqueza dos patrimônios genéticos de tais populações, em relação à população A, bem como a estruturação entre as populações. Os alelos exclusivos encontrados apresentaram-se em baixa frequência. As principais alterações nas frequências alélicas nas populações naturais podem ser atribuídas a forças evolutivas ou a processos reprodutivos e dispersivos. A equidade das frequências dos alelos está relacionada à variabilidade genética (fixação e perda de alelos) das populações e as suas respostas a perturbações e eventos de gargalo genético. Tais informações podem ser relevantes na determinação de áreas de preservação ou para construção de bancos de germoplasma.

Os valores encontrados para as populações de *Campomanesia xanthocarpa*, remetem a um possível contexto de perda de variabilidade genética. Esta perda de variabilidade, possivelmente por endogamia e/ou deriva, pode ser consequência da fragmentação florestal que pode estar interferindo nas taxas de autofecundação da espécie.

### Estrutura das populações

Segundo as estatísticas F de Wright (1951), há baixo nível de deficiência de heterozigotos, considerando as populações separadamente ( $Fis=0,02$ ). Valores positivos deste índice (Fis) foram encontrados para a maioria dos locos. Tais valores, apesar de pouco expressivos, não devem ser negligenciados. Significativa deficiência de heterozigotos foi evidenciada considerando o conjunto das populações ( $Fit=0,21$ ), bem como alto nível de diferenciação genética entre elas foi encontrado ( $Fst=0,19$ ), segundo Yeh (2000). Tais resultados sugerem ainda que não está ocorrendo fluxo gênico entre as populações, ou que este é insuficiente para evitar diferenças genéticas entre elas e para manter as proporções teóricas esperadas para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os resultados indicam que as populações estão em estruturação, em especial a população A das demais. Possivelmente esta estruturação é devida ao contexto de

fragmentação no qual a população A esta inserida.

O dendrograma baseado na similaridade genética entre os indivíduos agrupou os indivíduos da população A (isolada) entre si, formando um grupo isolado, enquanto os indivíduos das populações B e C (conectadas por outros fragmentos florestais) misturaram-se, formando um único grupo (Figura 4). O dendrograma comparando as populações com base na Distância genética de Nei (1978) também manteve a população A isolada das demais.

Almeida et al. (2012) trabalhando com uma população de *Eugênia uniflora*, oriunda do mesmo fragmento em que se encontra a população A de guaviroveira analisada no presente trabalho, observaram que a taxa de grão de pólen estéreis é significativamente maior quando comparada com populações não isoladas. Estes autores relacionam este resultado com a endogamia que pode estar ocorrendo nesta população. Os dados obtidos com os marcadores SSR para esta população (A) de *C. xanthocarpa* reforçam a hipótese do aumento da endogamia das espécies alógamas presentes neste fragmento isolado.

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com as características das populações de *C. xanthocarpa* estudadas. A população A é a mais isolada em relação às demais, configurando-se em um pequeno fragmento de vegetação próximo ao perímetro urbano, cercado por áreas agrícolas e de reflorestamento com espécies exóticas. As populações B e C estão em uma região contínua a uma área de preservação ambiental que apesar de fragmentada atualmente ainda apresenta corredores de vegetação comunicando os dois fragmentos. As populações B e C possuem características semelhantes, são maiores que a população A e mais próximas entre si. Aparentemente a população B é a mais preservada das populações estudadas.

## **Conclusões**

A alta transferibilidade e polimorfismo obtidos para os microssatélites estudados indicam a potencialidade da sua utilização em estudos de genética de populações com espécies arbóreas nativas, mesmo quando seu desenvolvimento não é uma opção. Os vários parâmetros genéticos intrapopulacionais e interpopulacionais analisados indicam que apesar das populações ainda apresentarem baixa similaridade e alta diversidade genética, há deficiência de heterozigotos e perda de variabilidade genética, bem como alta diferenciação genética entre as populações, o que por sua vez, possivelmente, é consequência do processo de fragmentação e redução florestal. A população A, menor e mais isolada, destacou-se das demais, apresentando a menor diversidade genética. Já o contrário foi verificado com a população B, enquanto que resultados intermediários foram obtidos para a população C. As

informações obtidas contribuem para o conhecimento acerca da espécie, gênero e família *Myrtaceae* e poderão ser úteis no aprofundamento de trabalhos conservacionistas e de exploração das espécies da família.

Nossos dados mostram o efeito negativo da fragmentação nos parâmetros genéticos de populações de *C. xanthocarpa*. Ao considerar que esta espécie é nativa e com características semelhantes as demais espécies arbóreas presentes da Mata Atlântica, questionamos se o que está acontecendo com *C. xanthocarpa* também poderia estar acontecendo com estas outras espécies. Se sim, podemos afirmar que a fragmentação florestal está colocando em risco o patrimônio genético das espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica. No entanto, para comprovar esta hipótese é necessário novos estudos com outras espécies deste bioma.

### Referências

- Almeida DJ, Faria MV, Da Silva PR (2012) Effect of forest fragmentation on microsporogenesis and pollen viability in *Eugenia uniflora*, a tree native to the Atlantic Forest. *Genet Mol Res* DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2012.September.20.2>
- Ballal RS, Foré SA, Guittman SL (1994) Apparent gene flow and genetic structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. *Can J Bot* 72: 1311-1315
- Berg EE, Hamrick JL (1997) Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Can J For Res* 27: 415-424
- Brasil, Ministério do meio ambiente (2012) Mata atlântica. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: agosto de 2012.
- Brondani C, Rangel PH, Borba TC and Brondani RP (2003) Transferability of microsatellite and sequence tagged site markers in *Oryza species*. *Hereditas* 138: 187-192.
- Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R, Grattapaglia D (1998) Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor Appl Genet* 97: 816-827
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR (1993) Incidence and origins of “null” alleles in (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 52: 922-7
- Charlesworth B, Siiegowski P, Stephan W (1995) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220
- Chase M, Kesseli R, Bawa K (1996) Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *Am J Bot* 83: 51-57
- Ciampi AY (1999) Desenvolvimento e utilização de marcadores microsatélites, AFLP e seqüenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, 204p.
- 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*). *Gen Mol Res*. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2011.November.29.2>. 2011.
- Dayanandan S, Bawa KS, Kesseli R (1997) Conservation of microsatellites Among tropical trees (Leguminosae). *Am J Bot* 84: 1658-1663

- Eisen JA (1999) Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds Goldstein DB, Schlötterer C), pp. 34-48. Oxford University Press, Oxford
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1995) Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN, documento 20, 220p.
- Ferreira-Ramos, R (2008) Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Eugenia uniflora* L. na região de Ribeirão Preto (SP), utilizando marcadores microsatélites. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto
- Gupta PK, Balyan HS, Sharma PC, Ramesh B (1996) Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Curr Sci* 70: 45–54
- Hartl DL, Clark AG (1997) *Principles of Population Genetics*. 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 542 pp.
- IBAMA Instituto brasileiro do meio ambiente e recursos naturais renováveis (2012) Mata Atlântica. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata\\_atlantica.htm](http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm)>. Acesso em: agosto de 2012
- Jones RC, Steane DA, Potts BM, Vaillancourt RE (2002) Microsatellite and morphological analysis of *Eucalyptus globulus* populations. *Can J For Res* 32: 59-66
- Kageyama PY, Gandara FB, Souza LMI, de (1998) Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. Série técnica IPEF 12: 65-70
- Klein RM (1960) O aspecto dinâmico do pinheiro-brasileiro. *Sellowia* 12: 17-48
- Koch Z, Corrêa MC (2002) Araucária: a floresta do Brasil meridional. *Olhar Brasileiro*, 160 pp.
- Lehman T, Hawley WA, Collins FH (1996) An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics Society of America* 144: 1155-1163
- Lewis PO, Zaykin D (2000) *Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data*, version 1.0 (d12)
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CF (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95: 255-273
- Milach SCK (1998) Marcadores de DNA. *Biotechnol Ciênc Des* 5: 14-17
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 70: 3321-3323
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York
- Oliveira EJ, Amorim VBO, Costa JL, Matos ELS, Castellen MS, Padua JG, Dantas JLL (2010) Polymorphism of microsatellite markers in papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Molecular Biology Reporter* 28: 519-530
- Parker GD, Chalmers KJ, Rathjen AJ, Langride P (1998) Mapping loci associated with flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 97:238–245
- Rafalski JA, Vogel JM, Morgante M, Powell W, Andre C, Tingey SV (1996) Generating and using DNA markers in plants. In: Birren B, Lai E (eds) *Non-mammalian genomic analysis: a practical guide*. Academic, London, pp 75–134
- Rao VR, Hodgkin T (2002) Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant cell Tiss Organ Cult* 68: 1-19
- Reitz R, Klein RM (1966) *Flora Ilustrada Catarinense: Araucariaceae*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues
- Rohlf FJ (1997) *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Setauket, NY: Exeter Software. NTSYS-PC 2.1.

- Romagnolo MB (2003) A família Myrtaceae na planície alagável do alto rio Paraná, estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 120p.
- Rossetto M, Slade RW, Baverstock PR, Henry RJ (1999) Microsatellite variation and assessment of genetic structure in tea tree (*Melaleuca alternifolia* - Myrtaceae) Mol Ecol 8: 633–644
- Sawczuk AR, Figueiredo Filho A, Dias NA, Watzlawick LF, Stepka TF (2011) Alterações na estrutura e na diversidade florística no período 2002-2008 de uma floresta ombrófila mista montana do centro-sul do Paraná, Brasil. Floresta 42: 1-10
- Schaff LB, Figueiredo Filho A, Galvão F, Sanquetta CR, Longhi SJ (2006) Modificações florístico-estruturais de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista Montana no período entre 1979 e 2000. Ciência Florestal 16: 271-291
- Sharma KK, Lavanya M, Anjaiah V (2000) A method for isolation and purification of peanut genomic DNA suitable for analytical applications. Plant Mol Biol Reporter 18: 393-393
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236: 787-792
- Thomé N (1995) Ciclo da madeira: história da devastação da Floresta de Araucária e do desenvolvimento da indústria madeireira em Caçador e na região do Contestado no século XX. Caçador: Universal
- Torggler MGF, Contel EPB, Torggler SP (1995) Isoenzimas –Variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 186.
- Vallilo MI, Moreno PRH, Oliveire E, Lamardo LCA, Garberlotti ML (2008) Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg. - Myrtaceae. Ciênc. Tecnol. Aliment. 28: 231-237
- White GM, Boshier DH, Powell W (1999) Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis*. Zucc. Mol Ecol 8: 1899-1909
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Hum Genet* 15: 395-420
- Yeh FC, Yang R Boyle TJ (2000). PopGene 3.12. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton
- Zipparro VB et al. (2005) Levantamento florístico de floresta atlântica no sul do estado de São Paulo. *Biota Neotrop.* <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032005000100015>
- 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. *Gen Mol Biol* 26: 449-457

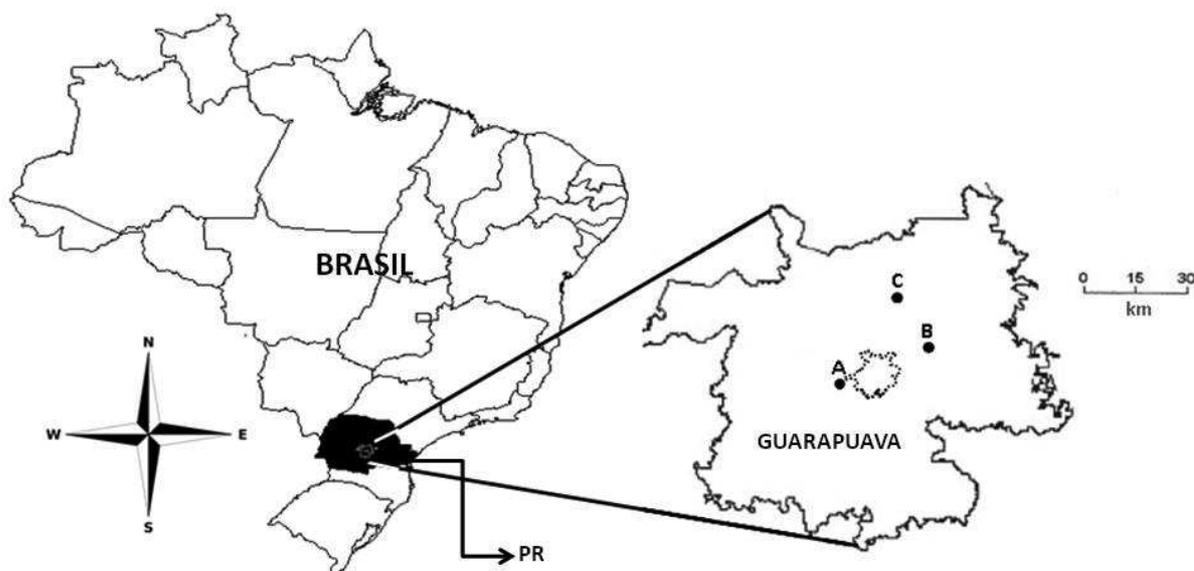
**Tabela 1.** Conjunto dos 13 pares de *primers* SSR desenvolvidos na família *Myrtaceae* utilizados para análise da estrutura genético-populacional de *C. xanthocarpa*. Temperatura de anelamento (TA); Tamanho esperado dos fragmentos em pares de bases (pb); Número de alelos amplificados (NA); Heterozigosidade esperada (He); Heterozigosidade observada (Ho) e Índice de Fixação de alelos (Fis).

Locos SSR <sup>1</sup>	TA	pb	NA	He	Ho	Fis
Embra14*	49°C	100-105	7	0,828571	0,766667	0,075298
Embra26*	50°C	155-320	3	0,657843	0,550000	0,165094
Embra63*	49°C	200-290	2	0,181513	0,200000	-0,102804
Embra69*	50°C	140-300	3	0,441036	0,583333	-0,326268
Embra123*	50°C	180-300	3	0,665517	0,431034	0,354327
Embra148*	50°C	180-300	5	0,680532	0,566667	0,168497
Embra166*	50°C	200-320	4	0,590336	0,466667	0,210891
Embra210*	49°C	195-210	3	0,584314	0,416667	0,288642
Eun5**	54°C	140-162	3	0,612465	0,516667	0,157531
Eun7**	54°C	196-202	3	0,638515	0,450000	0,296999
Eun11**	52°C	162-182	4	0,654482	0,583333	0,109530
Eun121**	54°C	205-215	2	0,018519	0,018519	0,000000
Scu052t***	49°C	305-345	4	0,627232	0,491228	0,218345

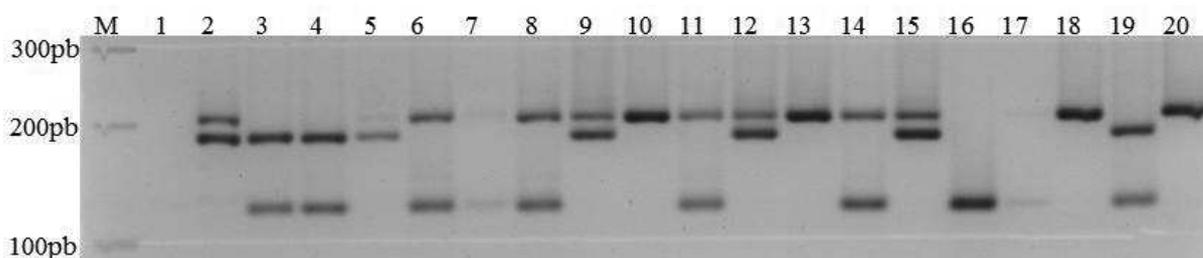
<sup>1</sup> Marcadores desenvolvidos por \*Brondani (1998); \*\* Ferreira-Ramos (2008); \*\*\* Rossetto (1999).

**Tabela 2.** Dados genético-populacionais de *C. xanthocarpa* obtidos com a amplificação de 13 pares de *primers* SSR.

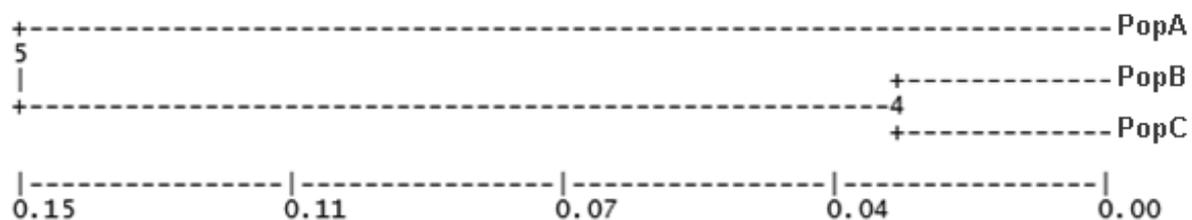
	Pop. A	Pop. B	Pop. C	Média
N = tamanho médio de amostra sobre todos os loci	19,84	19,69	19,61	19,71
P = Porcentagem de locos polimórficos	76,92%	100%	84,61%	87,18%
A = Média de alelos encontrados	2,61	3,38	2,84	2,94
Ap = Num. médio de alelos por locus polimórfico	3,10	3,38	3,18	3,22
He = Heterozigosidade esperada	0,42	0,53	0,45	0,47
Ho = Heterozigosidade observada	0,41	0,51	0,45	0,46
Fis = Índice de Fixação	0,035	0,032	0,003	0,02



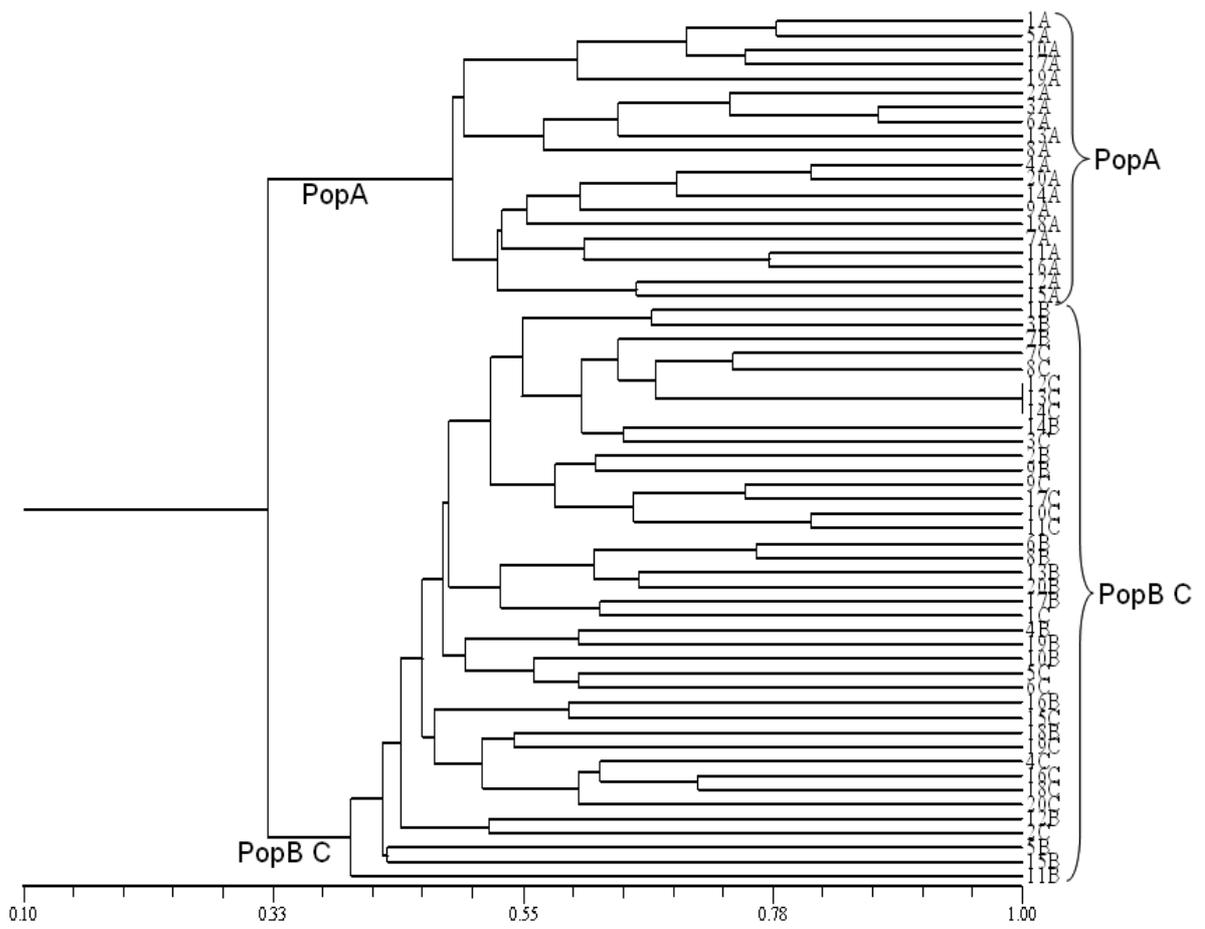
**Figura 1.** Localização das três populações de *C. xanthocarpa* Berg. estudadas neste trabalho (A, B e C). A linha pontilhada delimita a área urbana do município de Guarapuava, PR - Brasil.



**Figura 2.** Perfil eletroforético obtido com o par de *primer* Eun7 em *C. xanthocarpa* Berg. (População B), mostrando a amplificação de três alelos. M: Marcador de peso molecular de DNA (Ladder 100pb).



**Figura 3.** Dendrograma de agrupamento das três populações de *C. xanthocarpa* da região de Guarapuava-PR, Brasil pelo método UPGMA, baseado na Distância genética de Nei (1978).



**Figura 4.** Dendrograma de agrupamento dos 60 indivíduos das três populações de *C. xanthocarpa* Berg. da região de Guarapuava-PR, Brasil, pelo método UPGMA, baseado na Similaridade genética de Jaccard.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seleção natural atua sobre a composição genética de cada população, de maneira a moldá-la ao longo do tempo (TORGGLER et al., 1995). A variabilidade genética está interligada com a sobrevivência e adaptação das espécies (RAO; HODGKIN, 2002). O atual contexto de fragmentação e redução das florestas vem ocasionando à deterioração do patrimônio genético das populações naturais, pelo isolamento de populações menores que as originais. Em espécies de plantas nativas a fragmentação populacional pode ocasionar mudanças na composição genética das populações por comprometer o fluxo de genes entre seus indivíduos, aumento de endogamia e aceleração dos efeitos da deriva gênica, entre outras consequências (BALLAL et al., 1994).

Neste trabalho foi estimada a diversidade genética de três populações de *C. xanthocarpa*, localizadas na região de Guarapuava-PR, com o auxílio de seis marcadores moleculares dominantes (ISSR) e de 14 codominantes (SSR) heterólogos. As populações apresentaram diferenças evidentes, principalmente a população A em relação às demais, sendo a menor e mais isolada. As outras populações, B e C, são maiores, estão próximas à área de proteção ambiental da Serra da Esperança e aparentemente encontram-se mais preservadas que a população A, partilham da mesma formação florestal original e estão comunicadas a outros fragmentos florestais.

Seis *primers* ISSR, 50% dos marcadores testados mostraram-se suficientemente informativos e estáveis. Já com os marcadores SSR, de 21 *primers* testados, desenvolvidos em três espécies da família *Myrtaceae*, 14 (66%) foram transferidos com sucesso para *C. xanthocarpa*, dos quais apenas um caracterizou-se como monomórfico.

Os marcadores SSR já testados em literatura, não apresentam indícios de desequilíbrio de ligação, permitindo afirmar que os alelos dos diferentes locos analisados não estão associados e, portanto, segregam independentemente amostrando diferentes regiões do genoma (FERREIRA-RAMOS, 2008).

Os géis com os produtos de amplificação de alguns *primers* ISSR e SSR foram repetidos, apresentando resultados iguais ou muito próximos, reforçando a reprodutibilidade e credibilidade dos resultados obtidos com os marcadores utilizados. Considerável riqueza alélica (46 alelos) foi observada com SSR, bem como considerável número de fragmentos (64) foi amplificado com ISSR.

Os valores de similaridade genética média encontrados entre as populações com ambos os marcadores mostraram-se semelhantes e podem ser considerados baixos, tendo em

vista resultados obtidos em estudos similares com outras espécies. Estes resultados indicam alta diversidade genética, que é inversamente proporcional à similaridade.

Os agrupamentos UPGMA realizados a partir dos dados obtidos com os marcadores, embora baseados em coeficientes diferentes, similaridade genética de Jaccard e distância genética de Nei (1978), agruparam os indivíduos de acordo com a população a qual pertencem, indicando estruturação entre as populações com ISSR. A distribuição gráfica dos indivíduos de acordo com seus relacionamentos genéticos, realizada com os dados dos marcadores ISSR, também vai de encontro com o que foi mostrado nos dendrogramas, ou seja, os indivíduos de cada população mostraram-se mais próximos geneticamente.

Com os dados SSR, o agrupamento baseado na similaridade genética agrupou os indivíduos da população A, misturando os indivíduos das populações B e C. A população A, em todos os agrupamentos manteve-se mais distante das demais, concordando com as características observadas nas populações. As diferenças encontradas entre as populações podem ser devidas a características ambientais como condições de iluminação e proximidade da borda, por exemplo, ou ainda, a distância entre as populações, bem como as diferentes associações entre as espécies dos fragmentos. Tais resultados podem estar relacionados à estruturação entre as populações, o que, por sua vez, pode ser resultado do processo de fragmentação que a espécie vem enfrentando.

A porcentagem de locos polimórficos encontrada com ambos os marcadores também apresentaram valores próximos, 84,37% (ISSR) e 87,2% (SSR). Tais valores podem ser considerados altos quando comparados a outros resultados em trabalhos com outras espécies arbóreas, utilizando marcadores dominantes e codominantes. Em alguns trabalhos tal parâmetro é considerado como medida de diversidade.

O tamanho médio amostral com todos os locos evidenciou a ausência de produtos de amplificação com alguns indivíduos, o que pode ser explicado pela presença de alelos nulos, como possivelmente ocorre com um dos locos (Eun121). O número médio de alelos observado mostrou-se superior ao número efetivo de alelos, sendo suficiente para manter a heterozigosidade atual das populações, segundo os dados do marcador dominante. Com SSR, a média de alelos por loco polimórfico encontrada, apesar de possuir valor expressivo pode ser considerada baixa se comparada a resultados encontrados em trabalhos semelhantes.

Com SSR foi possível identificar cinco alelos exclusivos em duas das três populações (B e C). Com ISSR foram encontrados seis locos exclusivos na população B. Estes fatos destacam a importância genética de tais populações (B e C). Os alelos e locos exclusivos encontrados apresentaram-se em baixa frequência. As alterações das frequências alélicas nas

populações naturais podem ser atribuídas a forças evolutivas ou a alterações nos processos reprodutivos e dispersivos. A equidade das frequências alélicas está relacionada à variabilidade genética (fixação e perda de alelos) das populações e as suas respostas a perturbações e eventos de gargalo genético. Tais informações podem ser relevantes na determinação de áreas de preservação ou para construção de bancos de germoplasma.

A diversidade genética foi estimada com os dados do marcador dominante por meio de dois índices complementares, Shannon-Weaver e Nei (1973), que apresentaram valores expressivos entre as populações e próximos aos obtidos em outros trabalhos semelhantes com espécies arbóreas. A alta diversidade entre as populações merece destaque, no sentido de que pode indicar estruturação genética entre elas. Com os marcadores SSR, valores elevados de heterozigosidade dentro e entre as populações foram encontrados, se comparados a outros obtidos em estudos semelhantes. No entanto, apesar das altas diversidades encontradas, a heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) foi inferior à esperada ( $H_e$ ), de acordo com as proporções teóricas de Hardy-Weinberg para populações em equilíbrio. Portanto, há certo grau de deficiência de heterozigotos nas populações e isto também foi observado para a maioria dos locos estudados. O aumento da homozigose indicado pelos resultados possivelmente está relacionada à endogamia, coancestralidade e/ou aceleração da deriva, o que por sua vez é condicionado pela redução e isolamento das populações. Este contexto pode significar risco de erosão da base genética das populações estudadas. A população B apresentou os maiores valores de diversidade genética, enquanto a população A, os menores.

Alto nível de diferenciação genética ( $F_{st}$  e  $G_{st}$ ) foi encontrado entre as populações quando os marcadores ISSR foram utilizados. O índice de fixação de alelos intrapopulacional ( $F_{is}$ ) apresentou valor positivo para a maioria dos locos SSR. O índice de Fixação considerando o conjunto das populações ( $F_{it}$ ) indicou nível considerável de deficiência de heterozigotos, bem como alto nível de diferenciação genética ( $F_{st}$ ) foi encontrado com o marcador codominante. Portanto, os valores indicam estruturação entre as populações e perda de variabilidade genética (fixação de alelos), possíveis efeitos da fragmentação dos habitats. Tais resultados sugerem ainda que há baixo fluxo gênico ou que este é insuficiente para homogeneizar os alelos entre as populações e manter os níveis de heterozigosidade das populações em estruturação. O fluxo gênico está relacionado a fatores como distância entre as populações e os mecanismos de dispersão de pólen e de sementes, que no caso de *C. xanthocarpa* é realizado, respectivamente, principalmente por abelhas e por pássaros.

Algumas implicações quanto aos estudos genéticos utilizando marcadores transferidos, como a ocorrência de índices mais elevados de homozigotos têm sido relatadas, o que pode

ser explicado pela ocorrência de alelos nulos (CALLEN et al., 1993; LEHMAN et al., 1996), que são mascarados nos heterozigotos e podem levar a interpretações errôneas dos géis. (SOLTIS; SOLTIS, 1989). Devido aos padrões eletroforéticos observados e as altas heterozigosidades encontradas neste trabalho, o único *primer* que parece apresentar alelo nulo é o Eun121, sendo responsável pelo tamanho populacional médio reduzido. Foi possível verificar ainda com os dados dos SSR, a distribuição desigual dos alelos dentro das populações, ou seja, presença de alelos raros ou de baixa frequência.

Os valores encontrados com a população A de *Campomanesia xanthocarpa*, remetem a um possível contexto de perda de variabilidade genética, que pode ser consequência, entre outros fatores, da estruturação da população consicionada pela fragmentação. Tais dados evidenciam a importância de programas de conservação e recuperação da espécie.

A diferenciação genética entre as populações está diretamente relacionada ao sistema reprodutivo da planta, grau de fragmentação, distância entre os fragmentos, sistema de dispersão. O aparente cenário de estruturação das populações pode estar também alterando significativamente o sistema de cruzamentos de *C. xanthocarpa*, o que pode levar a um aumento da endogamia.

Os marcadores utilizados mostraram-se informativos, polimórficos e, portanto, eficientes para as análises, que possibilitaram estimar a diversidade genética intra e interpopulacional, evidenciando, portanto, sua potencialidade e viabilidade de sua utilização em estudos de genética de populações.

Os marcadores apresentaram semelhanças e discrepâncias acerca dos métodos, coeficientes, resultados, entre outros aspectos. Portanto, podem se configurar em uma ferramenta viável para estudos genéticos, separadamente ou complementarmente, de acordo com os objetivos de cada trabalho.

Com a espécie alvo deste trabalho não foram encontrados trabalhos, até então, acerca de diversidade genética utilizando marcadores moleculares. Obter o máximo de informações, de maneira a conhecer as populações nativas, o mais ampla e precisamente possível, faz-se evidentemente necessário, aumentando as chances de sucesso em programas de recuperação e preservação e/ou exploração comercial de tais espécies. Com uma perspectiva das mudanças que caracterizam uma população é possível prever como provavelmente responderá a eventos futuros, naturais ou não.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, D. J. de; FARIA, M.V.; SILVA, P.R. Effect of forest fragmentation on microsporogenesis and pollen viability in *Eugenia uniflora*, a tree native to the Atlantic Forest. *Genetic and Molecular Research*. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2012.September.20.2>. 2012.
- BACKES, P.; IRGANG, B. Árvores do Sul. Guia de identificação & interesse Ecológico. As principais espécies nativas Sul-Brasileiras. Santa Cruz do Sul. Instituto Souza Cruz. 2002.
- BALASARAVANAN T.; CHEZHIAN P.; KAMALAKANNAN R.; GHOSH M.; YASODHA R.; VARGHESE M.; GURUMURTHI K. Determination of inter- and intra-species genetic relationships among six *Eucalyptus* species based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *Tree Physiology*. 25: 1295-1302. 2005.
- BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 443p. 1999.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 209-215. 2001.
- BRANDÃO, M. M. Diversidade Genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 80f. 2008.
- BRASIL. 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. 2002.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Mata Atlântica. 2012. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: agosto de 2012.
- BRONDANI, R. P. V.; GAIOTO, F. A.; MISSIAGGIA, A. A.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. *Molecular Ecology Notes*. 3(2): 177-179. 2003.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 7: 46-50. 2003.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Colombo, PR: Embrapa Florestas. 2: 261-268. 2006.
- CHARLESWORTH B.; SIIEGOWSKI P.; STEPHAN W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*. 371: 215-220. 1995.
- CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany*. 83: 51-57. 1996.
- CIAMPI, A. Y. Desenvolvimento e utilização de marcadores microsatélites, AFLP e seqüenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, 204p. 1999.

- DA SILVA, P. R.; MILACH S. C. K.; TISIAN L. M. Transferability and utility of white oat (*Avena sativa*) microsatellite markers for genetic studies in black oat (*Avena strigosa*). *Genetic and Molecular Research*. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2011.November.29.2>. 2011.
- DAYANANDAN, S.; BAWA, K.S. and KESSELI, R. Conservation of microsatellites Among tropical trees (Leguminosae). *American Journal of Botany*. 84: 1658-1663. 1997.
- DESHPANDE, K. U.; APTE, G. S.; BAHULIKAR, R. A.; LAGU, M. D.; KULKARNI, B. O.; SURESH, H. S.; SINGH, N.; RAO, M. K.; GUPTA, V. S.; PANT, A.; RENJEKAR, P. K. Genetic diversity across natural populations of montane plant species from the western Ghats, India revealed by inter-simple sequence repeats. *Molecular Ecology*. 10: 2397–2408. 2001.
- EISEN, J. A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein DB, Schlotterer, C (eds) *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford, pp. 34–48. 1999.
- ELLSTRAND, N.C.; ELLAN, D.R. Population genetic consequences of small population sizes: implication for plant conservation. *Annual review of ecology and systematic*. 24: 217 - 242. 1993.
- ENGEL, S. R.; LINN, R. A.; TAYLOR, J. F.; DAVIS, S. K. Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. *Journal of Mammology*. 2: 504-518. 1996.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20, 220p. 1995.
- FERREIRA-RAMOS, R. Estrutura genética e fluxo genético em populações naturais de *Eugenia uniflora* L. na região de Ribeirão Preto (SP), utilizando marcadores microssatélites. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2008.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica. Período 2005 – 2008. Relatório Parcial. São Paulo, Fundação S.O.S. Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 156p. 2009.
- GALETTI JUNIOR, P. M.; RODRIGUES, F. P.; SOLE-CAVA, A. M.; MIYAKI, C. Y.; CARVALHO, D.; EIZIRIK, E.; VEASEY, E. A.; SANTOS, F. R.; FARIAS, I. P.; VIANNA, J. A.; OLIVEIRA, L. R.; WEBER, L. I.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FRANCISCO, M. R.; REDONDO, R. A. F.; SICILIANO, S.; DEL LAMA, S. N.; FREITAS, T. R. O.; HRBEK, T.; MOLINA, W. F. Genética da conservação na biodiversidade brasileira. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J.; BRISCOE, D.; GALETTI JUNIOR, P. M. (Org.). *Fundamentos de Genética da Conservação*. 1ed. Ribeirão Preto: SBG. 1: 199-229. 2007.
- GILLIES, A. C. M.; CORNELIUS, J. P.; NEWTON, A. C.; NAVARRO, C.; HERNANDEZ, M.; WILSON, J. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. *Molecular Ecology*. 6: 1133-1145. 1997
- GUPTA, PK.; BALYAN, HS.; SHARMA P. C.; RAMESH B. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Current Science*. 70: 45–54. 1996.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. *Principles of Population Genetics*. 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 542 pp. 1997.

- HUANG, J.; SUN S. M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea series Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*. 100: 1050–1060. 2000.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do meio ambiente e recursos naturais renováveis. Mata Atlântica (2012). Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata\\_atlantica.htm](http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm)>. Acesso em: 10 de agosto de 2012.
- JONES, R. C.; STEANE, D. A.; POTTS, B. M.; VAILLANCOURT, R. E. Microsatellite and morphological analysis of *Eucalyptus globulus* populations. *Canadian Journal. Forest Research*. 32: 59-66. 2002.
- KANIESKI, M. R. Caracterização florística, diversidade e correlação ambiental na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2010.
- KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do pinheiro-brasileiro. *Sellowia*. 12: 17-48. 1960.
- KNOWLES, P. Genetic variability among and within closely spaced populations of lodgepole pine. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 26: 177-184. 1984.
- KOCH, Z.; CORRÊA, M. C. Araucária: a floresta do Brasil meridional. Olhar Brasileiro. 2002.
- LIMA R. S. de; DAHER R. F.; GONÇALVES L. S.; ROSSI D. A.; et al. RAPD and ISSR markers in the evaluation of genetic divergence among accessions of *Elephant grass*. *Genetic and Molecular Research*. 10: 1304-1313. 2011.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 15: 65–95. 1984.
- LOWE, A. J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F; et al. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*. 95: 255-273. 2005.
- MARQUES, T. P. Subsídios à recuperação de formações florestais ripárias da Floresta Ombrófila Mista do Estado do Paraná, a partir do uso de espécies fontes de produtos florestais não madeiráveis. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 244p. 2007.
- MILACH S. C. K. Marcadores de DNA. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 5: 14-17. 1998.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. *Plant Journal*. 3: 175-182. 1993.
- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*. 30: 194-200. 2002.
- MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*. 14: 389–394. 1999.
- NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*. 13: 1143-1155. 2004.
- PARKER, G. D.; CHALMERS K. J.; RATHJEN, A. J.; LANGREID, P. Mapping loci associated with flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 97: 238–245. 1998.

- POTT, A.; POTT, V. J. Plantas do Pantanal. Brasília: Embrapa, 320 p. il. Press. 75-134. 1994.
- RAFALSKI, J. A.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; VOGEL, J. M.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIERREN, B. et al. (Ed.). plant genetics. *The Plant Journal*. 3(1): 175-182. 1996.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; REDDY, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. *Euphytica*. 128: 9-17. 2002.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M. Flora Ilustrada Catarinense: Araucariaceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966.
- ROMAGNOLO, M. B. A família Myrtaceae na planície alagável do alto rio Paraná, estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 120p. 2003.
- SAWCZUK, A. R.; FIGUEIREDO FILHO, A.; DIAS, N. A.; WATZLAWICK, L. F.; STEPKA, T. F. Alterações na estrutura e na diversidade florística no período 2002-2008 de uma floresta ombrófila mista montana do centro-sul do Paraná, Brasil. *Floresta*. 42: 1-10. 2011.
- SCHAAF, L. B.; FIGUEIREDO FILHO, A.; GALVÃO, F.; SANQUETTA, C. R.; LONGHI, S. J. Modificações florístico-estruturais de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista Montana no período entre 1979 e 2000. *Ciência Florestal*. 16(3): 271-291. 2006.
- SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Efeitos da fragmentação florestal em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. *Scientia Forestalis*. 57: 123-139. 2000.
- THOMÉ, N. Ciclo da madeira: história da devastação da Floresta de Araucária e do desenvolvimento da indústria madeireira em Caçador e na região do Contestado no século XX. Caçador: Universal. 1995.
- VALLILO, M. I.; MORENO, P. R. H.; OLIVEIRE, E.; LAMARDO, L. C. A.; GARBELOTTI, M. L. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 28: 231-237. 2008.
- VAN TREUREN, R.; BIJLSMA, R.; OUBORG, N. J.; VAN DELDEN W. The significance of genetic erosion in the process of extinction. IV. Inbreeding depression and heterosis effects caused by selfing and outcrossing in *Scabiosa columbaria*. *Evolution*. 47: 1669-1680. 1993.
- VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, L. C. A. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro, RJ: IBGE. 124 p. 1991.
- WALLACE, L. E. Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Species Biology*. 17: 37-49. 2002.
- WOLFE, A. D.; LISTON A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; DOYLE. J. J. [eds.], Molecular systematics of plants II, DNA sequencing, 43-86. Kluwer Academic Publishers, New York, New York, USA. 1998.

- ZIPPARRO V. B. et al. Levantamento florístico de floresta atlântica no sul do estado de São Paulo. *Biota Neotropical*. DOI: 10.1590/S1676-06032005000100015. 2005.
- ZORZETTO, R.; FIORAVANTI C.; FERRONI M. A floresta renasce. *Revista FAPESP*. 91: 10-23. 2003.
- ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO J. B.; CHAVES L. J.; COELHO A. S. G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetic and Molecular Biology*. 26(4): 449-457. 2003.