



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNA DELGADO GÓES

**ESTUDOS MOLECULARES EM *Campomanesia*
xanthocarpa O. BERG. (MYRTACEAE) NO ESTADO DO
PARANÁ**

Londrina
2019

BRUNA DELGADO GÓES

**ESTUDOS MOLECULARES EM *Campomanesia*
xanthocarpa O. BERG. (MYRTACEAE) NO ESTADO DO
PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia na área de Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas

Londrina
2019

BRUNA DELGADO GÓES

**ESTUDOS MOLECULARES EM *Campomanesia xanthocarpa* O.
BERG. (MYRTACEAE) NO ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia na área de Fitotecnia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Edmilson Bianchini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas
Faculdade de Apucarana – FAP

Dr^a Sara Mataroli de Godoy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2019.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Góes, Bruna Delgado.

Estudos moleculares em *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) no estado do Paraná / Bruna Delgado Góes. - Londrina, 2019.

85 f. : il.

Orientador: Paulo Mauricio Ruas .

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2019.

Inclui bibliografia.

1. Espécie nativa - Tese. 2. Marcadores moleculares - Tese. 3. Variabilidade genética - Tese. I. Ruas , Paulo Mauricio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina, ao programa de Pós-Graduação em Agronomia e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas e a Prof^a Dr^a Claudete de Fátima Ruas por terem me recebido tão bem a 5 anos, por todo conhecimento compartilhado, amizade e compreensão nos momentos difíceis.

Aos professores Prof. Dr. Edmilson Bianchini, Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves, Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas e a Pós-doutoranda Dr^a Sara Mataroli de Godoy por aceitarem o convite e participarem da banca examinadora.

A todos os professores que contribuíram com minha formação.

Aos funcionários da Universidade Estadual de Londrina, Dario, Edna e em especial, ao Edson Mendes Francisco (“Ed”) pela grande contribuição nas coletas e conhecimento prático.

Aos amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas, Eduardo Ruas, Kátia Rocha, Gabriela Navarro, Camila Ronchi, Camila Chaves, Thiago Fernandes, Nataiane Bejatto, Michely Bugança, Alana Padia, Jessica Pissolato, Natália Souza, Patrícia Lopes Oliveira, Gustavo Guidone, Renata Giacomini, Nicollas Aprígio, Gabriela Inocente, Jessica Delfini, Luana Massucato, Danielle Cassiano e Lucas Benício. Todos contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, obrigada pela amizade e todos os momentos juntos!

Aos amigos do LAGEA por todo apoio e aprendizado nas nossas conversas de corredor.

Aos amigos Sara Mataroli de Godoy e João Fernando M. Silva pela ajuda imensurável nas análises estatísticas e pela força na reta final!

Agradeço a toda minha família, em especial aos meus pais, Joana Márcia e Rogério, e aos meus irmãos Caio e Marcus, vocês são meus maiores exemplos. Amo vocês!

Ao meu marido, Ruan, divido essa conquista com você, pois sem seu apoio, amizade e amor, nada disso seria possível.

“A biodiversidade do planeta está sendo perdida numa taxa assustadora, de maneira que devemos agir agora para conservar o sistema que dá suporte às nossas vidas. Extinção é para sempre.”

Richard Frankham

GÓES, Bruna Delgado. **Estudos moleculares em *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) no estado do Paraná.** 2019. 85 p. Tese (Agronomia, Fitotecnia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A Mata Atlântica é conhecida como um dos biomas brasileiros mais importantes devido a seu nível de endemismo. Entretanto, este bioma tem sofrido um intenso processo de fragmentação do qual só lhe resta cerca de 8,5% em remanescentes florestais acima de 100 ha. *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) é comumente encontrada neste bioma e é frequentemente utilizada em programas de recuperação de áreas degradadas e de ambientes ripários. Devido a sua importância, foram desenvolvidos dez pares de locos microssatélites, por meio de biblioteca enriquecida, para avaliar a diversidade e estrutura genética de sete populações amostradas ao longo de sua área de distribuição no estado do Paraná e também comparou-se a diversidade genética entre indivíduos adultos e jovens em populações de três fragmentos. Foram analisados um total de 76 alelos em 172 indivíduos adultos e 25 alelos em 74 indivíduos jovens. A heterozigosidade observada (H_o) global foi significativamente menor do que a heterozigosidade média esperada (H_e) global, que pode indicar desvio nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg para toda área amostrada. A H_e não se apresentou estatisticamente diferente entre adultos e jovens, portanto, a diversidade genética é considerada igual e moderada para todas as populações. A maior parte da variação genética foi encontrada dentro das populações e o índice de diferenciação genética (F_{ST}) foi alto entre as mesmas. Foram detectados baixos níveis de migrantes entre as populações. A correlação entre distâncias geográficas e distâncias genéticas foi positiva, porém não significativa. Valores positivos e significativos de coeficiente de endogamia (F_{IS}) foram encontrados para a maioria das populações, provavelmente devido a fragmentação do habitat. Apenas a população de Irati apresentou três pares de locos em desequilíbrio de ligação, após a correção de Bonferroni. Não foi verificado efeito de gargalo recente nas sete populações amostradas. A análise bayesiana de agrupamento genético, a Neighbor-Net e PCoA indicaram a formação de três grupos genéticos para as populações adultas, sendo um *cluster* formado pelas populações Estação Ecológica do Caiuá e Mata São Francisco, o segundo *cluster* composto pelas populações de Mata dos Godoy, Ortigueira e Ventania e o terceiro *cluster* formado por Parque Nacional do Iguaçu e Irati. Para os jovens houve também a formação de três grupos genéticos, onde cada população jovem agrupou-se com sua respectiva população adulta. Mesmo não havendo diferenças significativas entre os parâmetros de diversidade genética das populações adultas e jovens, elas apresentaram níveis elevados de endogamia, o que pode levar a diminuição da diversidade genética futuramente. As populações encontram-se estruturadas, indicando fluxo gênico restrito e isolamento geográfico entre elas. Dessa forma, os resultados mostraram que as população de *C. xanthocarpa*, mesmo se apresentando estáveis, necessitam de programas de conservação e manejo, pois futuramente pode haver um declínio na variabilidade genética das mesmas.

Palavras-chave: Variabilidade genética; Fragmentação de habitats; Arbórea nativa; Genética de populações; SSR.

GÓES, Bruna Delgado. **Molecular studies in *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) in Paraná state.** 2019. 85 p. Tese (Agronomia, Fitotecnia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The Brazilian Atlantic Forest is known as one of the most important Brazilian biomes due to its level of endemism. However, this biome has undergone an intense fragmentation process, which about only 8.5% remains in forest remnants above 100 ha. *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), is commonly found in this biome and is often used in recovery programs for degraded areas and riparian environments. Due to its importance, ten pairs of microsatellite loci were used to evaluate the diversity and genetic structure of seven populations sampled throughout their distribution range, also, genetic diversity of adult and young individuals were compared in populations of three fragments. A total of 76 alleles were analyzed in 172 adult individuals and 25 alleles in 74 young individuals. The global observed heterozygosity (H_o) was significantly lower than the expected global heterozygosity (H_e), which may indicate deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for the entire sampled area. He did not present statistically differences between adults and young individuals, therefore, genetic diversity is considered equal and moderate for all populations. Most of the genetic variation was found within the populations and the genetic differentiation index (F_{ST}) was high among the populations. Low levels of migrants were detected among populations. The correlation between geographical distances and genetic distances was positive, but not significant. Positive and significant values of inbreeding coefficient (F_{IS}) were found for most populations, probably due to habitat fragmentation. Only the population of Irati presented three pairs of loci in linkage disequilibrium after the Bonferroni correction. No recent bottleneck effect was observed in the seven sampled populations. The Bayesian genetic cluster analysis, Neighbor-Net and PCoA, indicated the formation of three genetic groups for the adult populations, a cluster formed by the Estação Ecológica do Caiuá and Mata São Francisco populations, the second cluster composed of Mata dos Godoy, Ortigueira and Ventania populations and the third cluster formed by Parque Nacional do Iguaçu and Irati. For young individuals there were also the formation of three genetic groups, where each juvenile population grouped with its respective adult population. Although there were no statistically significant differences between the genetic diversity parameters of the adult and young populations, they presented high levels of inbreeding, which may lead to a decrease in genetic diversity in the future. The populations are structured, indicating restricted gene flow and geographic isolation between them. The results showed that the populations of *C. xanthocarpa*, even though presenting some stability, require conservation and management programs, because in the future there may be a decline in their genetic variability.

Key words: Genetic variability; Habitat fragmentation; Native tree; Population genetics; SSR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - *Campomanesia xanthocarpa*; **A)** Indivíduo adulto; **B)** tronco; **C)** flores e folhas **D)** frutos. **Fonte:** **A)** Viveiro Feltrin (2015); **B)** e **C)** Árvores do Bioma Cerrado (2016); **D)** Góes, B. D..... 17

ARTIGO B

Figura 1 - Localização das sete populações de *Campomanesia xanthocarpa* em fragmentos de Mata Atlântica no estado do Paraná. Agrupamentos genéticos estimados a partir do *software Structure* ao lado das populações. 42

Figura 2 - Curva de acumulação genotípica para oito locos de microssatélites aplicados à sete populações de indivíduos adultos e três populações de indivíduos jovens de *Campomanesia xanthocarpa*. Em azul, a formação de um platô na curva mostra a eficiência dos marcadores utilizados em discriminar os genótipos multilocus únicos da amostragem. 48

Figura 3 - Representação gráfica para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os locos de SSR amplificados nas sete populações de indivíduos adultos e três populações de indivíduos jovens de *Campomanesia xanthocarpa*. 51

Figura 4 - Correlação entre a distância genética (F_{ST} par a par) e distância geográfica (Km) de sete populações de *Campomanesia xanthocarpa* ($r = 0,46$; $P = 0,05$). Análise realizada pelo teste de Mantel por meio do método “Pearson” no R. Distâncias geográficas no eixo (x); Distâncias genéticas no eixo (y). 54

Figura 5 - Valores de Delta K (ΔK) estimados pelo *Structure Harvester* para as análises de agrupamento Bayesiano (*Structure*) de populações de *Campomanesia xanthocarpa*. A) Delta K para sete populações de indivíduos adultos. B) Delta K para três populações de indivíduos adultos e jovens. 57

Figura 6 - Análise de agrupamento Bayesiano para indivíduos adultos de sete populações de *Campomanesia xanthocarpa* a partir de marcadores SSR. A) *Bar plot* de $K = 2$, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 2583.466875$) como número

ótimo de K agrupamentos. B) *Bar plot* de K = 3, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 419.558145$) como segundo melhor número de K agrupamentos.....58

Figura 7 - Análise de agrupamento Bayesiano para indivíduos adultos (_A) e jovens (_J) de três populações de *Campomanesia xanthocarpa* a partir de marcadores SSR. A) *Bar plot* de K = 2, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 437.438713$) como número ótimo de K agrupamentos. B) *Bar plot* de K = 3, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 337.564769$) como segundo melhor número de K agrupamentos.58

Figura 8 - Neighbor-Net baseada em oito locos de SSR e inferida pelo software *SplitsTree* mostrando as relações filogenéticas entre sete populações de indivíduos adultos de *Campomanesia xanthocarpa*, a partir da distância de Prevosti. Cores de fundo codificadas de acordo como os três grupos genéticos designados pelo software *Structure*.59

Figura 9 - Neighbor-Net baseada em oito locos de SSR e inferida pelo software *SplitsTree* mostrando as relações filogenéticas entre três populações de indivíduos adultos (_A) e jovens (_J) de *Campomanesia xanthocarpa*, a partir da distância de Prevosti. Cores de fundo codificadas de acordo como os três grupos genéticos designados pelo software *Structure*.60

Figura 10 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA), inferida a partir da distância de Prevosti, para sete populações de indivíduos adultos de *Campomanesia xanthocarpa*.....61

Figura 11 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA), inferida a partir da distância de Prevosti, para três populações de indivíduos adultos (_A) e jovens (_J) de *Campomanesia xanthocarpa*.....61

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

Table 1 - Characteristics of 10 microsatellite loci developed in <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	30
Table 2 - Genetic parameters of the 10 microsatellites loci developed in <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	32
Table 3 - Significant linkage disequilibrium between 39 pairs of combinations pairs for ten microsatellite loci of <i>Campomanesia xanthocarpa</i> . ($P \leq 0.05$).....	33
Table 4 - Cross-amplification of 10 microsatellite loci tested in two species of <i>Campomanesia</i>	34

ARTIGO B

Tabela 1 - Localização, tamanho, altitude e formação florestal dos sete fragmentos de Mata Atlântica onde foram coletados indivíduos de <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	41
Tabela 2 - Parâmetros intrapopulacionais de diversidade genética de <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	49
Tabela 3 - Frequência de alelos nulos estimada pelo software FreeNA para todos os locos e populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	50
Tabela 4 - Presença de desequilíbrio de ligação para oito locos de microssatélites em populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	52
Tabela 5 - Análise de variância molecular (AMOVA) de populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> . Variação genética entre e dentro de populações e entre e dentro de populações adultas e seus respectivos jovens.	53
Tabela 6 - Distâncias entre populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> baseadas em oito locos de microssatélites. Valores de diferenciação genética (F_{ST}) entre pares acima da diagonal e distâncias geográficas (Km) abaixo da diagonal.	54
Tabela 7 - Estimativas das taxas médias de fluxo gênico contemporâneo entre as sete populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> . A proporção de não migrantes se encontra na diagonal, em negrito.	55
Tabela 8 - <i>P</i> -valores do teste de Wilcoxon para eventos de gargalo genético realizado a partir de oito locos de microssatélites em sete populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.2	OBJETIVOS	14
1.2.1	Objetivos Gerais	14
1.2.2	Objetivos Específicos	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE	15
2.2	EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PLANTAS	18
2.3	DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES	20
2.4	MARCADORES MOLECULARES NOS ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA	22
2.4.1	Marcadores Microssatélites	24
3	ARTIGO A	26
3.1	RESUMO	27
3.2	ABSTRACT	28
3.3	INTRODUCTION	28
3.4	MATERIAL AND METHODS	29
3.5	RESULTS AND DISCUSSION	31
3.6	CONCLUSIONS	34
4	ARTIGO B	36
4.1	RESUMO	37
4.2	ABSTRACT	38
4.3	INTRODUÇÃO	38
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.4.1	Coleta Do Material E Extração De DNA	40
4.4.2	Amplificação Dos Locos De Microssatélites Em Sete Populações De <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	42
4.4.3	Análise Estatística	43
4.5	RESULTADOS	46
4.5.1	Diversidade E Estrutura Genética	46
4.6	DISCUSSÃO	62
4.6.1	Diversidade Genética Em <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	62
4.6.2	Estrutura Genética De Populações Em <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	67
4.7	CONCLUSÃO	69

5	CONCLUSÕES GERAIS	70
	REFERÊNCIAS – ARTIGO A.....	71
	REFERÊNCIAS – ARTIGO B.....	74

1 INTRODUÇÃO

A imensa diversidade encontrada nas florestas tropicais, que abriga mais de 60% de todas as espécies conhecidas no mundo (BRADSHAW et al., 2009) tem sido foco de diversos estudos de estrutura de populações (MORI et al., 2012; CONSON et al., 2013; CHAVES et al., 2017). Dentre os principais biomas, a Mata Atlântica apresenta-se em destaque, uma vez que este é caracterizada por elevados níveis de diversidade (MYERS et al., 2000), sendo um dos biomas mais explorados no mundo. No entanto, sua área diminuída vêm sendo drasticamente reduzida nos últimos 100 anos a fragmentos relictuais.

A fragmentação florestal reduz áreas de vegetação contínua em paisagens compostas por agricultura e fragmentos florestais de diversos formatos e tamanhos. O isolamento destes fragmentos pode afetar processos genéticos como fluxo gênico, seleção e sistema de reprodução (YOUNG; BOYLE, 2000). Em curto prazo, a fragmentação pode levar a uma redução do tamanho populacional devido à perda de indivíduos, resultando na perda imediata de alelos (RODRIGUES, 2014). Além disso, a fragmentação florestal possui outras consequências como o aumento da endogamia, processo que quando ocorre em populações alógamas pode resultar no acúmulo de alelos deletérios recessivos e, conseqüentemente, menor fecundidade, levando possivelmente à extinção de populações (REED, 2005).

Por conta da intensa fragmentação de habitats houve um interesse maior em avaliar as consequências genéticas decorrentes da mesma em populações de espécies arbóreas tropicais (MIRANDA, 2014; GÓES, 2014; CHAVES, 2017; MASSUCATO, 2018). O estudo da estrutura de populações proporciona, acima de tudo, visões a respeito da conservação, da variabilidade genética de populações naturais e restauração de paisagens fragmentadas (CONSON et al., 2013). Avaliar os efeitos que a fragmentação do habitat exerce sobre a diversidade e estrutura genética das espécies animais e vegetais é fundamental para que medidas efetivas de conservação sejam tomadas (FRANKHAM et al., 2008).

Campomanesia xanthocarpa O. Berg. é uma espécie arbórea frutífera pertencente a família Myrtaceae, comumente chamada de gabirola, guabirola, guavirola, guabirola-miúda e guabirola-do-mato. Encontra-se distribuída desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, em quase todas as formações florestais (LORENZI, 2002). É uma espécie decídua, mesófito até heliófito e seletivo higrófito,

sendo abundante nas partes úmidas das florestas de altitude em capões e em florestas de galeria, chegando por vezes, a ser uma das espécies dominantes nas submatas mais abertas (REITZ, 1977). Tem grande capacidade de se adaptar à diferentes condições ambientais, sendo importante para recuperação de áreas degradadas (PIMENTA, 1998), inclusive, comporta-se muito bem em áreas alagáveis, reforçando também sua importância na recuperação de ambientes ripários. A madeira é usada na produção de instrumentos musicais, agrícolas, como cabo de ferramnetas, carvão, cerca e tabuado (ALICE et al., 1995). Enquanto os frutos têm grande potencial econômico, apresentam polpa abundante e suculenta, sendo comestíveis e saborosos (SANT'ANNA, 2012).

Diversas técnicas de marcadores moleculares têm sido utilizadas em estudos de genética de populações de espécies arbóreas naturais. Dentre essas diferentes técnicas, os marcadores microssatélites tem apresentado grande importância devido ao grande conteúdo informativo por loco. Sendo utilizado em diversos estudos de diversidade e estrutura genética de arbóreas tropicais, tais como: *Handroanthus heptaphyllus* (MORI et al., 2012), *Copaifera langsdorffii* (CARVALHO et al., 2010), *Myracrodruon urundeuva* (VIEGAS et al., 2011), *Eugenia uniflora* L. (AGUIAR et al., 2013), *Luehea divaricata* (CONSON et al., 2013), *Parapiptadenia rigida* (SOUZA et al., 2013), *Chrysophyllum gonocarpum* (RODRIGUES, 2014), *Aspidosperma polyneuron* (CHAVES et al., 2017; MASSUCATO, 2018).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos Gerais

Aplicar marcadores moleculares microssatélites para estudar a diversidade e estrutura genética de populações naturais da espécie arbórea *C. xanthocarpa* em fragmentos florestais no estado do Paraná.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Desenvolvimento de uma biblioteca enriquecida de microssatélites para *C. xanthocarpa*, construção e validação dos primers desenvolvidos;
2. Verificar a variabilidade genética em 7 populações adultas e 3 populações jovens de *C. xanthocarpa* que ocorrem no estado do Paraná;
3. Verificar se as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e caso não estejam explicar que fatores levaram a este desequilíbrio;
4. Verificar se as populações estão em desequilíbrio de ligação e caso não estejam se há relação com a deriva genética;
5. Verificar se, no passado recente, ocorreu alterações no tamanho efetivo das populações;
6. Verificar se ocorreu fluxo gênico uni ou bidirecional entre as populações;
7. Verificar se existe diferenças dos parâmetros genéticos entre as populações adultas e jovens;
8. Verificar se as populações estudadas precisarão no futuro de manejo genético para recuperar ou manter a sua variabilidade genética.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

Campomanesia xanthocarpa Berg. é uma Myrtaceae frutífera lenhosa e uma das 3.600 espécies distribuídas em mais de 100 gêneros que compõem esta família botânica (BARROSO, 1991). Conhecida popularmente como gabioba, guabirobeira, guavirova, guabioba-miúda e guabirobeira-do-mato. Apresenta as seguintes sinônimas botânicas: *C. crenata*, *C. dusenii*, *C. littoralis*, *C. malifolia* e *C. rhombea*. Nativa do Brasil, esta espécie encontra-se distribuída desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, em quase todas as formações florestais (LORENZI, 2002), sendo também encontrada no Uruguai, Argentina e Paraguai (BIAVATTI et al., 2004). Planta decídua, mesófita até heliófita e seletiva higrófita, é abundante nas partes úmidas das florestas de altitude (semidecídua e de pinhais), em capões e em matas de galeria, chegando por vezes, a ser uma das espécies dominantes nas submatas mais abertas (REITZ, 1977), comum na floresta estacional semidecidual da bacia do

Paraná e rara na floresta ombrófila da encosta atlântica (LORENZI, 1992). Na sucessão ecológica, que é o fenômeno que envolve gradativas variações na composição específica e na estrutura da comunidade florística (HORN, 1974), *C. xanthocarpa* é considerada espécie secundária tardia (DIAS et al., 1998), ou seja, possui um ciclo de vida médio a longo.

A espécie pode se apresentar como arbusto, arvoreta ou árvore de 10 a 20 m de altura e até 60 cm de diâmetro (Figura 1- A; B); os ramos jovens são glabros. As folhas são verdes e opostas, simples, membranáceas, ovalado-oblongas, medindo de 4-10 cm de comprimento por 3-4,5 cm de largura (VALLILO et al., 2008). Suas flores são bissexuais, esbranquiçadas com pedúnculos unifloros ou reunidos sobre pequenos ramos laterais, medindo de 1,0 a 3,5 cm (Figura 1 - C), as flores ainda são indicadas como melíferas muito apreciada pelas abelhas. *C. xanthocarpa* floresce durante os meses de setembro a novembro e os frutos amadurecem de outubro a dezembro (PIMENTA, 1998). Os frutos são de formato redondo e de cor verde quando jovens e amarelos e adocicados quando maduros. A dispersão é zoocórica atraindo, principalmente, as aves, dentre as quais os sabiás, saíras e sanhaços (VALLILO et al., 2008).

Segundo Santos (2015), *C. xanthocarpa* apresenta autoincompatibilidade homomórfica gametofítica, que é um sistema onde o grão de pólen germina e a reação de incompatibilidade ocorre entre o tubo polínico e o estilete (BITTENCOURT Jr, 2003). A autoincompatibilidade é um dos mais importantes fenômenos observados em angiospermas e sua ocorrência evita a autofecundação e possibilita manter uma alta diversidade intraespecífica (BARRETT,1988).

Os frutos de *C. xanthocarpa* (Figura 1 – D) têm grande potencial econômico, apresentam polpa abundante e succulenta, sendo comestíveis e saborosos. Os mesmos podem ser consumidos *in natura* ou utilizados na produção de sucos, sorvetes e licores, além da produção de doces caseiros, o que indica a presença de substâncias pécticas em teores significativos (SANT'ANNA, 2012). Os frutos de gabioba apresentam ainda propriedades nutricionais devido seu alto teor de vitamina C, sais minerais e compostos fenólicos, o que permite considerá-los como alimento funcional (LORENZI, 2002). Ainda, o chá das folhas de *C. xanthocarpa* é bastante citado, sendo a infusão dessas folhas utilizada no tratamento de diversas doenças, incluindo inflamatórias, renais e digestivas (ALICE, 1995).

Estudos realizados nas folhas dessa espécie indicaram a presença de

flavonoides, taninos, saponinas e óleo essencial (MARKMAN, 2002). O teor de óleo encontrado foi de 0,11%, sendo o linalol (29%) e globulol (20%) identificados como os principais componentes do óleo. A madeira de *C. xanthocarpa* é usada na produção de instrumentos musicais, agrícolas, carvão, cerca e tabuado (ALICE, 1995). A lenha é apreciada para sapecagem e torrefação da erva mate, pois desprende um aroma agradável durante a combustão (CORRÊA, 1974). A espécie também é indicada para o paisagismo, pois apresenta copa piramidal densa bastante decorativa (CRAVO, 1994).

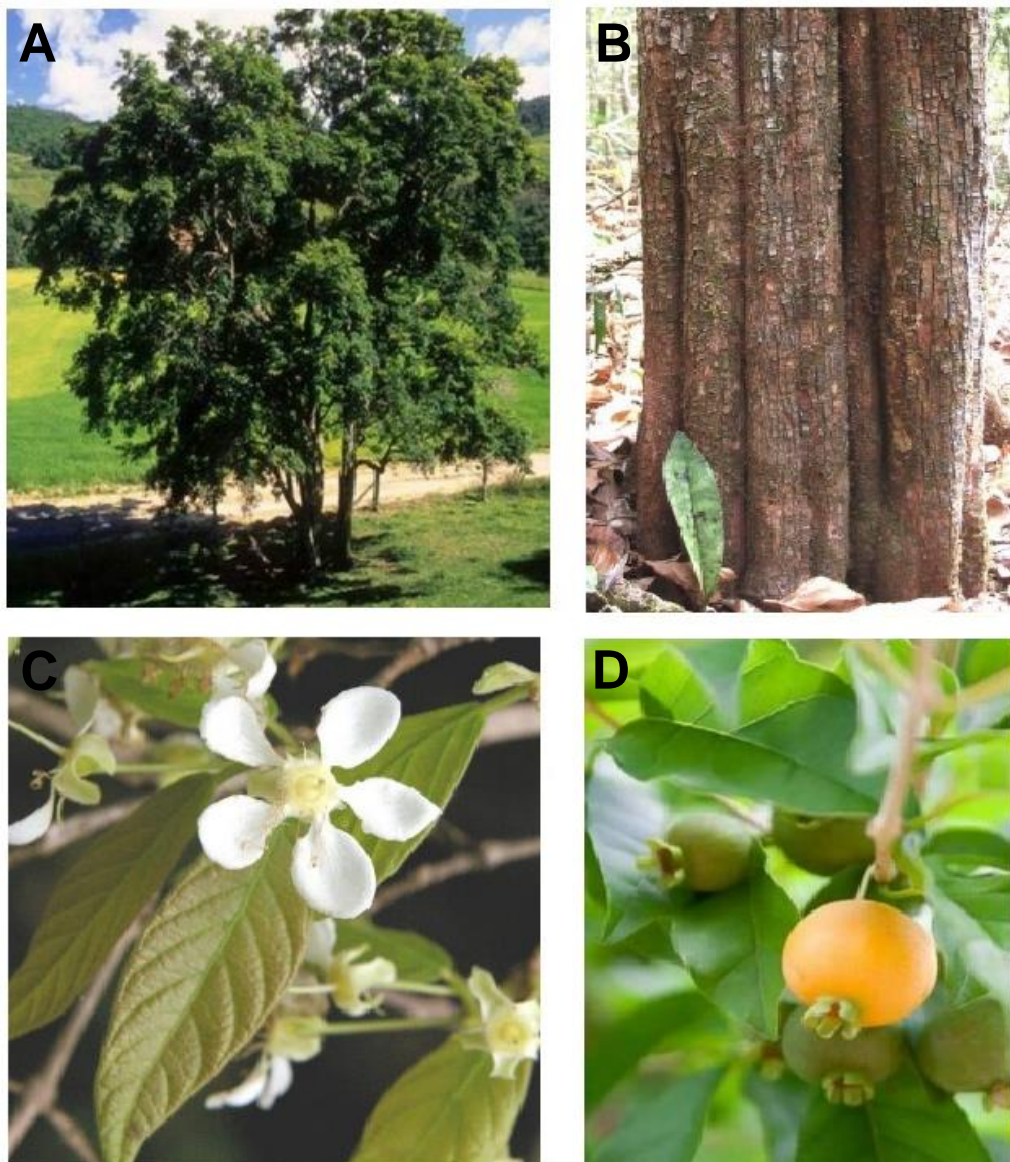


Figura 1 - *Campomanesia xanthocarpa*; A) Indivíduo adulto; **B)** tronco; **C)** flores e folhas e **D)** frutos.
Fonte: A) Viveiro Feltrin (2015); **B)** e **C)** Árvores do Bioma Cerrado (2016); **D)** Góes, B. D.

Devido a sua plasticidade fenotípica, *C. xanthocarpa* tem grande capacidade de se adaptar à diferentes condições ambientais, o que é um importante indicativo

da potencialidade desta espécie para ser utilizada em programas de recuperação de áreas degradadas (PIMENTA, 1998). Além disso, comportando-se, inclusive, muito bem em áreas alagáveis, reforçando também sua importância na recuperação de ambientes ripários.

2.2 EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PLANTAS

O processo de fragmentação refere-se a mudanças na configuração de um habitat devido a subdivisões em fragmento menores e o consequente isolamento destes (FAHRIG, 2003). Devido aos poucos remanescentes de florestas tropicais intactas no mundo, surge a necessidade de preservar as unidades de paisagens, outrora contínuas, que sofreram algum tipo de ruptura no habitat (RANTA et al., 1998). Diversos autores citam a importância de conexão entre os fragmentos, mesmo os pequenos, para assegurar o estabelecimento de corredores de vegetação, para permitirem a fauna se movimentar de um fragmento para outro, e também uma maneira de se tentar minimizar problemas como o efeito de borda (MORELLATO; HADDAD, 2000), que deixam os remanescentes expostos a alterações bióticas, abióticas e ecológicas (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A perda de habitats e a fragmentação reduzem a conectividade da paisagem, limitando a dispersão de sementes, polinização, colonização e levando as populações a um isolamento geográfico, colocando em risco a manutenção da variação genética e persistência das populações (PUTTKER et al., 2011). Além disso, a fragmentação pode levar a ruptura das interações ecológicas, visto que as populações possuem relações entre indivíduos da própria espécie como entre indivíduos de outras espécies, por exemplo, plantas e seus polinizadores. Desta forma, a fragmentação também pode influenciar na produção de sementes, pois esta afeta a densidade e o tamanho populacional de animais e suas atividades, como é o caso dos polinizadores e dispersores de sementes (MENGES, 1991). Em virtude do isolamento entre as plantas, mesmo na presença de seus polinizadores, a distância na dispersão do pólen tende a aumentar limitando o fluxo gênico entre os indivíduos, podendo ocasionar futuros gargalos genéticos (HANSON et al., 2008). Segundo Gonzales e Hamrick (2005), estudos realizados em populações fragmentadas de espécies de árvores mostraram que a fragmentação provoca diminuição ou interrupção do fluxo gênico pela diminuição das taxas de visita de insetos

polinizadores e animais dispersores de sementes, o que, em último caso, reduz a diversidade genética e altera a estrutura genética populacional.

A diminuição da diversidade genética tem implicações quanto a persistência de espécies e populações. A perda de alelos leva à redução na capacidade das espécies de responder a adversidades ambientais em gerações futuras e pode ocorrer redução na adaptabilidade das espécies (YOUNG et al., 1996). Desta forma, quanto maior a variabilidade genética presente na população, maiores serão as chances da espécie perdurar naquele ambiente (RODRIGUES, 2014).

A fragmentação induz a uma redução imediata no número de alelos, devido a um restringimento populacional (CASCANTE et al., 2002). O pequeno tamanho efetivo das populações nos fragmentos torna as futuras gerações cada vez mais frágeis, devido ao aumento da endogamia, a perda de alelos pelo efeito da deriva genética (SHIMIZU et al., 2000) e ao aumento da diferenciação genética entre as populações (ELLSTRAND; ELAM, 1993). A endogamia ainda tem por consequência a depressão endogâmica, que é uma redução do desempenho reprodutivo da espécie devido ao cruzamento de indivíduos aparentados (SEBBENN et al., 2000).

Aspectos como o tamanho dos fragmentos e a distância entre eles são fatores importantes nas análises de estrutura populacional, pois a distância entre os remanescentes florestais e a densidade da matriz estão relacionados com a possibilidade de colonização de espécies e, conseqüentemente, a troca de genes entre as populações (ONIPCHENKO; PAVLOV, 2009; HANSKI et al., 2013). Embora nos fragmentos menores as populações sejam mais afetadas por conta da diminuição da diversidade genética, Ranta et al. (1998) observaram que estes fragmentos pequenos têm sua importância na manutenção da diversidade das espécies, pois quando próximos uns dos outros, funcionariam como unidades que constituem pontos de ligação, ou *stepping stones*, que são pequenos fragmentos dispersos pela matriz que podem, para algumas espécies, facilitar o fluxo entre esses fragmentos.

2.3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A diversidade biológica do planeta tem sido reduzida rapidamente como consequência das ações antrópicas. Sua conservação torna-se cada vez mais necessária, fundamentada pelo valor econômico que os recursos biológicos representam, pela importância dos serviços ambientais prestados, pelos valores estéticos e pelas destacáveis razões éticas (FRANKHAM et al., 2008).

A variabilidade genética constitui o material básico para a evolução das espécies (SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012). A existência de diversidade genética dentro de populações é uma condição fundamental para que a evolução siga naturalmente. Segundo Frankham et al. (2008), a seleção natural atua sobre a variabilidade genética dentro das populações em relação a adaptação ao ambiente, permitindo variabilidade entre populações e por fim, variabilidade entre as espécies.

Esta variabilidade genética pode ocorrer em três níveis distintos: 1) de espécies dentro de ecossistemas; 2) de populações dentro de espécies; e 3) de indivíduos dentro de populações de espécies (SILVA et al., 2012). Diversos processos naturais podem reduzir ou aumentar a diversidade genética dentro de populações naturais. Processos que podem inserir variabilidade genética continuamente nas populações são basicamente dois: mutação e migração, e esta pode ser perdida por deriva genética, cruzamentos endogâmicos e seleção natural (COLE, 2003). A perda da variabilidade genética pode aumentar a suscetibilidade a diversos fatores bióticos e abióticos, perda de alelos por incompatibilidade, fixação de alelos deletérios e declínio na aptidão ecológica das espécies (AGUIAR et al., 2013).

O aumento dos níveis de diversidade genética a partir da ocorrência de mutações ocorre a longo prazo, cerca de centenas a milhares de gerações, com taxas de mutação que ocorrem em valores muito baixos (ALLENDORF; LUIKART, 2007). A migração ou fluxo gênico, o movimento de alelos entre as populações, pode ter efeitos muito grandes sobre as frequências alélicas e é muito mais efetiva em restaurar a diversidade genética do que a mutação, pois permite a homogeneização das frequências alélicas em contraste aos efeitos da deriva genética. Existem diversos exemplos na natureza onde taxas de migração tão baixas como um migrante por geração é o suficiente para prevenir as populações de divergirem geneticamente (FRANKHAM et al., 2008).

Dentre os processos que podem diminuir a diversidade genética está a deriva genética, que se caracteriza por flutuações aleatórias na frequência alélica de uma população ao longo do tempo (HARTL; CLARK, 2007). Este processo pode ser detectado a partir da queda na proporção de locos polimórficos e no número de alelos por locos (FUTUYMA, 2018). Sebbenn e Etori (2001) observaram que a redução das populações naturais tem levado a uma perda de genes adaptados a ambientes específicos em espécies arbóreas e que a redução contínua no tamanho das populações as submete a perdas de variabilidade genética por deriva genética.

A endogamia é outro processo que reduz a diversidade genética, principalmente em populações de tamanho efetivo pequeno, devido a uma maior probabilidade de autofecundação e cruzamento entre indivíduos aparentados. Com o tempo, todos os indivíduos tornam-se relacionados de tal maneira que acasalamentos entre indivíduos não relacionados são impossíveis (FRANKHAM et al., 2008). A endogamia é de profunda importância na biologia da conservação, uma vez que ela leva a redução na heterozigosidade, na reprodução, devido ao aumento da frequência de homozigotos para alelos recessivos deletérios. A perda do vigor reprodutivo como consequência da endogamia é referida como depressão endogâmica (FRANKHAM et al., 2008).

O conhecimento da variabilidade genética é uma forma de auxiliar nas estratégias de manejo e de conservação genética. Vários autores têm utilizado a técnica de marcadores moleculares para acessar a variabilidade genética em populações naturais (FERREIRA, 2013; RODRIGUES, 2014; GODOY et al., 2017). Os parâmetros mais utilizados para estimar a diversidade genética em populações naturais e as alterações decorrentes de ações antrópicas, são: número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e índice de fixação (f) (BERG; HAMRICK, 1997).

A distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações naturais, descrita como estrutura genética, é resultado direto da combinação entre mutação, migração, seleção e deriva genética (BRADBURD et al., 2013). A estrutura genética de populações pode ser avaliada por meio de diversas metodologias, entre elas: coeficiente de ancestralidade de Cockerham (WEIR, 1996); as estimativas de diversidade genética de Nei (NEI, 1973; 1978), que fornece a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações (GONZALES; HAMRICK, 2005); estatísticas F de Wright (WRIGHT, 1965), que identifica níveis médios dos índices de

fixação alélica de uma população subdividida (F_{IT}), o acasalamento não casual dentro de populações (F_{IS}), à divergência genética entre populações (F_{ST}) e o fluxo gênico (Nm) (PEREZ, 2008).

2.4 MARCADORES MOLECULARES NOS ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA

Com a introdução de técnicas de genética molecular, no início da década de 80, os estudos de identificação, caracterização e mapeamento genético passaram a ser realizados com maior segurança, rapidez e eficiência. O advento dos marcadores moleculares possibilitou a discriminação genotípica de forma hábil, pois permite o estudo da variação genética em nível de DNA (SOUZA, 2015).

A primeira técnica descrita para obtenção de marcadores genéticos de DNA baseia-se na ação de enzimas de restrição após o reconhecimento de uma sequência de DNA, no qual o marcador RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é fundamentado. Os marcadores RFLP tornaram-se uma ferramenta útil e importante, porém, possui algumas desvantagens práticas, como, grau de dificuldade e o alto custo da técnica quando aplicada a um grande número de indivíduos, tornando preferível a utilização de marcadores baseados em PCR (HAKEEM et al., 2013).

O surgimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), na década de 80, permitiu a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, ocasionando uma revolução nas técnicas de biologia molecular. O uso da PCR em análises genéticas permite uma melhor compreensão de processos de especiação, padrões de biogeografia em nível da espécie, bem como a estrutura genética de populações, mapas genéticos, identificação de cultivares, paternidade de híbridos, entre outros. Os marcadores de DNA mais utilizados em estudos genéticos de plantas são o RAPD (*Random Fragment Polymorphic*), o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), o SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou microssatélites (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) e ainda, os SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Dentro dos estudos de genética de conservação, os marcadores AFLP são muito utilizados. Estudos comparativos mostram que o AFLP é a técnica mais eficiente para estimar a diversidade genética e por esse motivo é amplamente utilizada no estudo da diversidade genética em diferentes espécies de plantas. As

principais vantagens da técnica de AFLP incluem o grande número de polimorfismos por reação, sem a necessidade de conhecimento prévio do genoma, e o baixo custo para execução (HAKEEM et al., 2009). A técnica AFLP tem como base a amplificação seletiva por PCR de fragmentos de restrição derivados de uma digestão total do DNA genômico; promove uma moderna e muito poderosa técnica de DNA *fingerprinting* para DNA de qualquer origem ou complexidade. Porém, apesar da vantagem de detecção de alta taxa de polimorfismo, os marcadores gerados por AFLP são dominantes, e não identificam variantes alélicas em um loco específico, não sendo possível uma distinção dos genótipos heterozigotos (CAIXETA et al., 2013).

Os SNPs são o tipo mais frequente de variação encontrada no DNA. São polimorfismos de única base onde ocorre uma pequena mudança ou variação genética na sequência de DNA, um único nucleotídeo substituindo um dos outros três nucleotídeos (GIUSTI et al., 2016), podendo ser polimorfismos bi-, tri- ou tetra-alélicos. Estas variações genéticas são codominantes e de fácil detecção quando comparados, por exemplo, aos microssatélites (SANTORO, 2010). Sua grande vantagem reside na abundância de polimorfismos entre alelos de um determinado gene e ampla distribuição, podendo estar presentes em, praticamente, todos os locos gênicos. Devido à alta frequência de ocorrência nos genomas, os SNPs são uma rica fonte de variabilidade que podem ser utilizados para saturar mapas genéticos, são potencialmente úteis para a associação de mapeamento de características de interesse agrônomo (GIUSTI et al., 2016), e também muito utilizados para estudos de conservação genética em arbóreas, como rastreabilidade da origem de madeira (CHAVES et al., 2017). Apesar de funcionarem, as metodologias utilizadas para a detecção dos SNPs são relativamente custosas quando comparadas a outros marcadores moleculares.

Um ponto importante a ser considerado é a adequação do tipo de marcador molecular ao objetivo da pesquisa, uma vez que cada marcador é baseado em diferentes princípios, o que os fazem diferir quanto à consistência e tempo para obtenção de resultados; nível de polimorfismos; custo e facilidade de implementação; e reprodutibilidade (FERRÃO et al., 2013).

2.4.1 Marcadores Microsatélites

Os microsatélites ou sequência simples repetida (*Simple Sequence Repeat - SSR*) são repetições em tandem de 1 a 6 nucleotídeos, encontrados em todos os procariotos e eucariotos estudados (ZANE et al., 2002). São marcadores codominantes, multialélicos, altamente informativos, baseados em PCR, reproduzíveis, com ampla cobertura do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os microsatélites foram encontrados no genoma de eucariotos no final da década de 80 e logo os pesquisadores perceberam os altos níveis de polimorfismo deste marcador, comprovando que se tratava de uma nova ferramenta molecular bastante eficiente, com pelo menos o dobro de informações, as quais são obtidas duas ou mais vezes mais rapidamente do que outros marcadores. (ZANE et al., 2002).

Os marcadores microsatélites tornaram-se extremamente difundidos na biologia, sendo atualmente utilizados em um grande número de estudos para investigar a estrutura genética de populações, respondendo a perguntas específicas nas áreas da biologia evolutiva e da conservação (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). Isto se dá devido a três características presentes nos microsatélites: (1) a neutralidade, pois representam o genoma inteiro; (2) a abundância com ampla distribuição pelo genoma; e (3) o alto polimorfismo encontrado mesmo em populações que passaram por eventos como gargalos ou em populações que possuem baixo polimorfismo detectado por outros marcadores (MAUDET et al., 2002).

Devido à alta variabilidade dos microsatélites e à possibilidade de se obter marcadores mendelianos multialélicos, eles são especialmente úteis para inferir eventos demográficos recentes, inclusive detecção de impactos induzidos pelas comunidades humanas nas populações (PEARSE; CRANDALL, 2004). Os microsatélites vêm sendo muito utilizados para responder várias perguntas relacionadas à genética de populações, como análises de fluxo gênico, paternidade e estruturação populacional, que resultam em dados sobre a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações naturais, que são essenciais para a adoção de medidas de conservação tanto *ex situ* quanto *in situ* (OLIVEIRA et al., 2006).

Os microssatélites são ainda automatizáveis em sistemas *multiplex*, o que possibilita avaliar um grande número de indivíduos para um grande número de locos em curto prazo (AZEVEDO et al., 2007). Por conta de todas essas características vantajosas, os marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética de populações naturais (RAPOSO et al., 2007; CONSON et al., 2013; VIEIRA et al., 2016; CHAVES et al., 2017)

3 ARTIGO A¹

GÓES, Bruna Delgado

Characterization of microsatellite loci for *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae) and cross amplification in related species

¹Artigo aceito para publicação na revista Acta Scientiarum Biological Sciences

Desenvolvimento e caracterização de locos microssatélites para *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae) e transferabilidade para espécies relacionadas

Bruna Delgado Góes¹, Eduardo Augusto Ruas^{2,3}, Lucas Milanez Benício³, Daniele Cassiano³, Felipe Pinheiro de Souza⁴, Paulo Maurício Ruas^{1,3}

3.1 RESUMO

Campomanesia xanthocarpa é uma árvore nativa que ocorre em quase todas as formações florestais brasileiras, e seus frutos e sua madeira possuem alto valor comercial. Foram isolados e caracterizados locos de microssatélites para estimar parâmetros de diversidade genética para essa espécie e outras relacionadas. Vinte e oito locos de microssatélites foram identificados a partir de uma biblioteca genômica enriquecida, sendo que dez locos foram amplificados e mostraram-se polimórficos em quatro populações naturais após análise em 96 indivíduos. O número de alelos por loco variou de Dois a oito, e as heterozigosidades observadas e esperadas variaram de 0,042 a 1,000 e de 0,294 a 0,855, respectivamente. Esses marcadores foram testados e validados em duas espécies relacionadas (*C. eugenioides* e *C. guazumifolia*). Os marcadores microssatélites serão utilizados em posteriores estudos de genética de populações para *C. xanthocarpa*, a fim de compreender a variabilidade genética e determinar a conservação da espécie.

Palavras-chave: Árvore nativa; Diversidade genética; Gabiroba; Marcador molecular; *Simple Sequence Repeat* (SSR).

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, CEP: 86057-970.

²Faculdade de Apucarana, Apucarana, Paraná, Brasil, CEP: 86811-500.

³Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, CEP: 86057-970.

⁴Departamento de Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, CEP: 86057-970.

Autor para correspondência: edu_wicca@yahoo.com.br

3.2 ABSTRACT

Campomanesia xanthocarpa is a native tree, of common occurrence in almost all Brazilian Forest formations, which has its fruits and timber with high commercial value. Using an enriched genomic library we isolated and characterized microsatellite loci for *C. xanthocarpa* (Myrtaceae), in order to estimate genetic diversity parameters for this and related species. Twenty-eight microsatellite loci were identified and ten of them successfully amplified and showed polymorphism in a sample of 96 individuals, from four natural populations. The number of alleles per locus ranged from two to eight, and the observed and expected heterozygosities varied from 0.042 to 1.000 and from 0.294 to 0.855, respectively. These markers were tested and validated in two related species (*C. eugenioides* and *C. guazumifolia*). The microsatellite markers will be used in further studies of population genetics of *C. xanthocarpa*, in order to understand the genetic variability and to define the strategies needed for the conservation of the species.

Keywords: Gabiroba; Genetic diversity; Molecular marker; Native tree; Simple sequence repeat (SSR).

3.3 INTRODUCTION

Campomanesia xanthocarpa O. Berg (Myrtaceae) is a tree species commonly known as Gabirobeira or just Gabiroba, which can reach from 10 to 20 m high with an elongated and dense top (Lorenzi, 2002). This species occurs naturally in Brazil in almost all forest formation and it can also be found in Uruguay, Argentina and Paraguay (Biavatti et al., 2004).

C. xanthocarpa produces a large amount of seeds that are widely disseminated by the avifauna. The species has an important role in environmental preservation, mainly for the restoration of riparian vegetation and for the recovery of degraded areas. The fruits of *C. xanthocarpa* have great economic value, either as consumed “fresh” or in the preparation of candies, sorbets and homemade liqueurs (Lorenzi, 2002). Its wood is used in the production of musical instruments, agriculture, firewood, coal, fence and plank. The species presents medicinal value in

the fight against dysentery, fever, scurvy, and urinary tract diseases (Alice et al., 1995; Cravo, 1994).

Due to the selective logging, *C. xanthocarpa* is undergoing severe loss of genetic variability that can lead to the extinction of many natural populations, thus, it is necessary to know the genetic structure of the species in order to maintain their genetic variability (Chaves et al., 2014).

The simple sequence repeat (SSR) marker is a powerful technique for characterizing allelic diversity and it is frequently used in population studies due to their high level of polymorphism and codominant inheritance (Ellegren, 2004; Deng et al., 2015). The purpose of our study was to develop and characterize microsatellite loci for *C. xanthocarpa* for further application in population genetic studies and to boost strategies for conserving the genetic resources of this species and to assess cross-amplification in two related species.

3.4 MATERIAL AND METHODS

Genomic DNA from *C. xanthocarpa* and related species was extracted using the Doyle and Doyle (1987) protocol, with some modification in which CTAB (Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) was replaced by MATAB (Mixed Alkyltrimethylammonium Bromide). A microsatellite-enriched library was developed for *C. xanthocarpa* using the hybridization capture method (Billotte et al., 1999), with biotin-labeled (CT)₈, (GT)₈ and (AGA)₅ probes in the enrichment step. Genomic DNA (5µg) from *C. xanthocarpa* was digested with *RsaI* (Promega, Madison, USA) and blunt-ended fragments were linked to adapters Rsa-21 and Rsa-25 (Edwards et al., 1996). Fragments containing repeats were selected by hybridization with the biotinylated oligonucleotides and recovered by streptavidin-coated magnetic beads (Invitrogen-Dynal, Lillestrøm, Norway). Microsatellite-rich fragments were amplified by PCR with the Rsa 21 adapter, cloned into the pGEM-T Easy vector II (Promega, Madison, WI, USA) and transformed into *Escherichia coli* XL1Blue MRF supercompetent cells (Agilent Technologies, Stratagene Products Division, La Jolla, CA, USA). Plasmids from 192 individual colonies were isolated, and the inserts were sequenced using the sequencing kit BigDye terminator version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the automated sequencer 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence fragments were screened for microsatellites using the Gramene program markers database (Ware et

al., 2002). Fragments containing microsatellite with dinucleotides or trinucleotides repeated more than four times and surrounded by a flanking region suitable for primer design were chosen for further study. Although the (CT)₈, (GT)₈ and (AGA)₅ probes were used for pre-cloning enrichment, other repeat motifs were also found in the cloned products (Table 1). Primer pairs complementary to sequences flanking the repeat elements were designed using the PRIMER3 version 0.4.0 (Rozen and Skaletsky, 2000). A total of 28 primer pairs were synthesized and tested for amplification, 10 primers showed clear and consistent amplification patterns.

Table 1 - Characteristics of 10 microsatellite loci developed in *Campomanesia xanthocarpa*.

Locus	Primer sequences (5'–3')	Repeat motif	Size range (bp)	T _a (°C)	PIC	GenBank accession no.
CXAN1	F: TCATCACAATCGGTTTCATCG R: GGTTTCAGTGTACACCAAGTG	(GC) ₃ (GA) ₂ (GT) ₂ (CT) ₂	121-330	52°C	0.851	MH230138
CXAN2	F: CTCGGTTAGATGCGATGGAT R: GCTTCTTCATGGGACAATGG	(CAT) ₃	114-130	63°C	0.679	MH230139
CXAN5	F: GGGAGGAGAACTGGAGAAGG R: CAAGCTTCGATCAATTC	(AAG) ₃	257-279	61,3°C	0.492	MH230140
CXAN6	F: AAAGCATTGGAGGATGATGC R: TGTTGCAGTTTCCAGTTTGC	(CA) ₃ TGTTGC(CA) ₃	127-147	63°C	0.697	MH230141
CXAN10	F: GTTGGGTTTGCTAGGGACAA R: TGAAAACAATTCCTCGCACA	(GA) ₄ A(GA)	124-139	53,8°C	0.537	MH230142
CXAN13	F: TTCACGCGTCCTTCACATAG R: GAAAGCCATATCCTCCTCCAC	(AAAT) ₄	121-139	63°C	0.716	MH230143
CXAN16	F: CCAATGACGTCCAACCTCAGA R: CGATTGGGACAAGAAAGGTG	(CAC) ₃ n(TC) ₃	154-173	58,6°C	0.493	MH230144
CXAN18	F: TTGGCAGTGAGTTGCATAGG R: ATCCACATCTTCCGATGACC	TG) ₃ GAT(TA) ₃	121-160	52°C	0.693	MH230145
CXAN27	F: GAAAGGGCACTTGCTTATGG R: GTCAGATTTGGCCGATGGT	(CCA) ₃	124-133	53,8°C	0.531	MH230146
CXAN28	F: TGCGATGTTGTCTTTAGGG R: GGTTTGCTAGGGACAACCA	(TC) ₄	129-156	53,8°C	0.695	MH230147

Note: T_a = annealing temperature (°C); PIC = polymorphic information content;

PCR amplification and the efficiency of each primer pair were tested in a sample of 96 individuals from four populations of *C. xanthocarpa* (24 individuals per population). Three collection sites were from Paraná state, including Fazenda Doralice (23°16'00.0"S and 51°03'00.0"W; Voucher FUEL 17164), Parque Estadual Mata São Francisco (23°27'00.0"S and 51°15'00.0"W; Voucher FUEL 55710) and RPPN Fazenda Duas Barras (23°0'2"S and 52°54'50"W; Voucher UPCB 18338); and the last one was from São Paulo state, Horto Florestal de Palmital (22°48'00.0"S and 50°16'00.0" W; Voucher FUEL 55282). Cross-amplification was tested in other two species of *Campomanesia*; *C. eugenioides* (24° 1'12.23"S and 50°53'48.77"W;

Voucher FUEL 42813) and *C. guazumifolia* (23°19'43.37"S and 51°12'10.86"W; Voucher FUEL 55400) using 10 plants from each species.

PCR reactions were performed using a 10 μ L volumes containing 4.5 μ L GoTaq Green Master Mix (2 \times buffer, pH 8.5, 1600 μ M dNTP e MgCl 3mM; Promega, Madison, WI, USA), 0.08 μ L of M13-tailed (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') forward primer (5pM), 0.32 μ L of reverse primers (5pM) and 0.32 μ L of 5 μ M solution of M13-labelled (6-FAM, HEX, NED or PET) primers, 2 μ L (10 ng) of genomic DNA and 2.78 μ L of nuclease free water. Primer amplification was performed on a PTC200 (MJ Research, California, USA) under the cycling conditions: denaturation at 95°C for 3 min; 35 cycles of 94°C for 40 s, specific annealing temperature (Table 1) for 40 s, 72°C for 40 s, 7 cycles at 94°C for 30 s, 53°C 45 s, 72°C for 45 s and final extension at 60°C for 40 min. PCR products were purified using ExoProStar 1 step purification kit (GE Healthcare Life Science, NY. USA) and run in the ABI 3500-xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genetic analysis of the fragments was carried out using the GeneMarker® v.2.3 software (Soft Genetics, State College, PA, USA) with manual correction to reduce the chance of increasing the occurrence of null alleles. For characterization of the polymorphic loci, it was applied the standard population genetic statistics, such as number of alleles (K), observed (*H_o*) and expected (*H_e*) heterozygosities, polymorphic information content (PIC), calculated by Cervus v. 2.0 software (Marshall et al., 1998). The exact test for linkage disequilibrium (Lewontin, 1964) ($P < 0.05$) was assessed using the software Arlequin version 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) and the presence of null alleles was tested using the software Micro-Checker (Van Oosterhout et al., 2004).

3.5 RESULTS AND DISCUSSION

The sequences of the 10 microsatellite loci were submitted to Genbank and registered under the accession numbers cited in Table 1. The genotyping of 96 individuals of *C. xanthocarpa* identified a total of 61 alleles, with the sizes of the fragments varying from 114 (C_{xan2}) to 330 bp (C_{xan1}) (Table 1). The polymorphic information content varied from 0.492 (C_{xan5}) to 0.851 (C_{xan1}) (Table 1). According to Botstein et al. (1980), the level of polymorphism at a specific loci can be considered high when the PIC >0.5 (Table 1), therefore, most of the analyzed loci had high polymorphic information content. The number of alleles per locus ranged

from two to eight (Table 2), and the mean of alleles per locus across all populations was 3.95. Means of observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities were, respectively, 0.274 and 0.528 (Fazenda Doralice), 0.262 and 0.528 (Parque Estadual Mata São Francisco), 0.236 and 0.613 (Horto Florestal de Palmital), 0.329 and 0.590 (RPPN Fazenda Duas Barras) (Table 2).

Table 2 - Genetic parameters of the 10 microsatellites loci developed in *Campomanesia xanthocarpa*.

Locus	Fazenda Doralice (n=22)			Parque Estadual Mata São Francisco (n=24)			Horto Florestal de Palmital (n=26)			RPPN Fazenda Duas Barras (n=24)		
	A	H_o	H_e	A	H_o	H_e	A	H_o	H_e	A	H_o	H_e
Cxan1	5	0.909	0.796	6	0.958	0.796	5	0.923	0.756	5	1.000	0.708
Cxan2	3	0.000	0.385	3	0.000	0.465	6	0.000	0.627	5	0.000	0.582
Cxan5	3	0.333	0.446	3	0.304	0.517	2	0.250	0.481	3	0.773	0.591
Cxan6	3	0.227	0.475	3	0.250	0.503	7	0.346	0.855	7	0.708	0.790
Cxan10	2	0.000	0.474	3	0.000	0.543	5	0.000	0.670	4	0.000	0.684
Cxan13	3	0.045	0.551	4	0.042	0.653	6	0.000	0.673	4	0.000	0.635
Cxan16	2	0.333	0.303	3	0.238	0.556	2	0.150	0.450	4	0.063	0.542
Cxan18	5	0.762	0.639	4	0.792	0.733	4	0.577	0.577	3	0.750	0.550
Cxan27	2	0.000	0.512	2	0.000	0.454	3	0.000	0.486	3	0.000	0.294
Cxan28	8	0.136	0.701	5	0.042	0.648	5	0.115	0.556	3	0.000	0.528

Note: A = number of alleles sampled; H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity; n = number of individuals sampled.

Pairwise comparisons for multiple tests among the polymorphic loci showed significant linkage disequilibrium between loci (Table 3), while 8 loci showed significant evidence for the presence of null alleles (Cxan2, Cxan5, Cxan6, Cxan10, Cxan13, Cxan16, Cxan27, Cxan28) according to Bonferroni correction ($P \leq 0.05$), which can indicate homozygosity excess.

The 10 loci were tested for cross-amplification using annealing temperature gradients in two species of the genus *Campomanesia*: *C. guazumifolia* and *C. eugenioides* (Table 4). The primers Cxan 2, Cxan13 and Cxan27 showed inconsistent amplification for all species tested, while primers Cxan1, Cxan5, Cxan6 and Cxan18 amplified for all species. Loci Cxan10 and Cxan16 showed amplification only for *C. guazumifolia* and Cxan28 only for *C. eugenioides*.

Table 3 - Significant linkage disequilibrium between 39 pairs of combinations pairs for ten microsatellite loci of *Campomanesia xanthocarpa*. ($P \leq 0.05$).

Locus	Cxan1	Cxan2	Cxan5	Cxan6	Cxan10	Cxan13	Cxan16	Cxan18	Cxan27	Cxan28
Cxan1										
Cxan2	+									
Cxan5	+	+								
Cxan6	+	+	+							
Cxan10	+	+	-	+						
Cxan13	+	+	-	+	+					
Cxan16	+	+	+	-	+	+				
Cxan18	+	+	-	+	-	+	+			
Cxan27	+	+	-	+	+	+	+	+		
Cxan28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

The patterns of genetic polymorphism observed in *C. xanthocarpa* for 10 microsatellite loci suggest that these markers can be used as valuable sources of information for the actual level of genetic conservation of *C. xanthocarpa* in their distribution area. A similar study was carried out by Ruas et al. (2009) and the microsatellite loci developed by those authors were employed by Conson et al. (2013), to verify if the forest fragmentation that began last century, in South and Southeast Brazil affected the genetic variability of the tree species *Luehea divaricata*. Chaves et al. (2017) used microsatellite loci, developed by Ramos et al. (2011), to demonstrate the apomictic and sexual reproduction, pollen and seed dispersion of the tree species *Aspidosperma polyneuron*.

We also tested the developed markers for cross-species amplification, with a success in the transferability rate of five and six loci for *C. eugenioides* and *C. guazumifolia*, respectively (Table 4). The transferability of polymorphic microsatellite markers in plants is likely to be successful, mainly within genera (success rate close to 60% in eudicots and close to 40% in the monocots). Between genera, transfer rates are approximately 10% for eudicots, and researchers of monocots, such as orchids or grasses, are very unlikely to get away without isolating novel markers from the genomes of new target genera. An exception is the large adaptive radiations with low levels of DNA sequence divergence such as Bromeliaceae, where polymorphic markers are readily transferred between species of the same subfamily and beyond (Barbará et al., 2007).

Table 4 - Cross-amplification of 10 microsatellite loci tested in two species of *Campomanesia*.

Locus	<i>C. eugenioides</i> (Cambess.) D. Legrand	<i>C. guazumifolia</i> (Cambess) O.Berg
Cxan1	+	+
Cxan2	-	-
Cxan5	+	+
Cxan6	+	+
Cxan10	-	+
Cxan13	-	-
Cxan16	-	+
Cxan18	+	+
Cxan27	-	-
Cxan28	+	-

Comparing our results employing the 10 microsatellite loci developed and validated for *C. xanthocarpa* with similar work cited in literature we observed the high potential of these markers, to estimate parameters of genetic diversity and population structure in further studies for this species, as well, for other related species tested for cross-amplification. Also, the produced data will be valuable in conservation and management programs aiming the recovering of degraded areas.

3.6 CONCLUSIONS

In this study, we developed 28 microsatellite markers for the tree species *C. xanthocarpa*, 10 of which were polymorphic. Tested for cross-amplification, five and six loci successfully amplified in the related species *C. eugenioides* and *C. guazumifolia*, respectively. The development of novel microsatellite markers will be an important tool to understand the consequences of selective logging that have affected the genetic diversity of *C. xanthocarpa* and other related species present in the same area.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

4 ARTIGO B¹

GÓES, Bruna Delgado

**ESTUDOS MOLECULARES DE *Campomanesia*
xanthocarpa O. BERG. (MYRTACEAE) NO ESTADO DO
PARANÁ**

¹Este artigo será submetido a revista Canadian Journal of Forest Research.

4.1 RESUMO

Neste estudo foram utilizados oito pares de locos microssatélites para avaliar a diversidade e estrutura genética de populações adultas e jovens de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) no Estado do Paraná. Foram analisados um total de 76 alelos em 172 indivíduos adultos e 25 alelos em 74 indivíduos jovens. A heterozigosidade observada (H_o) global foi significativamente menor do que a heterozigosidade média esperada (H_e) global, que pode indicar desvio nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg para toda área amostrada. A H_e não se apresentou estatisticamente diferente entre adultos e jovens. A maior parte da variação genética foi encontrada dentro das populações e o índice de diferenciação genética (F_{ST}) foi alto. Foi detectado baixos níveis de migrantes entre as populações. Correlação entre distâncias geográficas e distâncias genéticas foi positiva, porém não significativa. Valores positivos e significativos do coeficiente de endogamia (F_{IS}) foram encontrados para a maioria das populações, provavelmente devido a fragmentação do habitat. Não foi verificado efeito de gargalo recente nas populações amostradas. As populações encontram-se estruturadas, com fluxo gênico restrito e isolamento geográfico. Os resultados mostraram que as populações de *C. xanthocarpa*, mesmo se apresentando estáveis, necessitam de programas de conservação e manejo, pois, futuramente, pode haver um declínio em sua variabilidade genética.

Palavras-chave: Arbóreas nativas; Fragmentação de habitats; Genética de populações; SSR; Variabilidade genética.

4.2 ABSTRACT

In this study we used eight pairs of microsatellite loci to evaluate the diversity and genetic structure of adult and young populations of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) in the State of Paraná. A total of 76 alleles were analyzed in 172 adult individuals and 25 alleles in 74 young individuals. The global observed heterozygosity (H_o) was significantly lower than the expected global heterozygosity (H_e), which may indicate deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for the entire sampled area. He did not present statistically differences between adults and young individuals. Most genetic variation was found within populations and F_{ST} index was high. Low levels of migrants were detected among populations. Correlation between geographical distances and genetic distances was positive, but not significant. Positive and significant values of F_{IS} were found for most populations, probably due to habitat fragmentation. No recent bottleneck effect was observed in the sampled populations. The populations are structured, with restricted gene flow and geographic isolation. The results showed that the populations of *C. xanthocarpa*, even though performing some stability, require conservation and management programs, because in the future there may be a decline in their genetic variability.

Keywords: Genetic variability; Habitats fragmentation; Native trees; Population genetics; SSR.

4.3 INTRODUÇÃO

As florestas têm um importante papel ambiental, social e econômico, pela oferta de uma variedade de bens e serviços e por proporcionar abrigo à fauna, conservação da biodiversidade, de recursos hídricos, do solo e estabilidade do clima. A área florestal do Brasil corresponde a 60,7 % de florestas naturais e 0,8 % de plantadas (SBF/SNIF 2016). No entanto, a exploração dessas áreas florestais, anteriormente contínuas, reduz o tamanho populacional e aumenta o isolamento desses fragmentos, no qual pode alterar a estrutura demográfica, sistemas de acasalamento, diversidade genética e viabilidade a longo prazo das espécies de árvores nas florestas (Ghazoul 2005). Corte seletivo aliado a fragmentação de florestas pode reduzir a densidade de árvores, mudar o padrão de cruzamento, o

que aumenta a probabilidade de endogamia (Jennings et al. 2001), interrompendo o fluxo de genes e aumentando o efeito de deriva, podendo diminuir a diversidade genética por meio de gargalos genéticos e levar as populações a um maior isolamento e diferenciação populacional (Frankham 2008). A longo prazo, a perda de diversidade genética tende a reduzir a capacidade das populações de responderem as mudanças das pressões seletivas (Futuyma 2018).

Considerando que espécies arbóreas são perenes e possuem geralmente longa vida, a detecção de efeitos da redução populacional se torna difícil e, portanto, estudos em adultos e progênies podem ajudar a esclarecer os efeitos ecológicos e genéticos nas populações (Viegas et al. 2011). Diversos trabalhos têm reportado os efeitos da fragmentação na diversidade e estrutura genética de populações arbóreas (Finger et al. 2012), muitos deles em espécies do bioma Mata Atlântica (Chaves et al. 2017).

Campomanesia xanthocarpa é uma espécie arbórea, podendo atingir de 10 a 20 metros de altura, dotada de uma copa alongada e densa. Nativa do Brasil, esta espécie encontra-se distribuída desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, em quase todas as formações florestais (Lorenzi 2002). Os frutos são de formato redondo e de cor verde quando jovens e amarelos e adocicados quando maduros, tendo grande potencial econômico, seja como alimento *in natura* ou na preparação de doces, sorvetes e licores caseiros (Alice 1995). Sua madeira é usada na produção de instrumentos musicais e agrícolas, lenha, carvão, cerca e tabuado. Apresenta valor medicinal no combate à disenteria, febre, escorbuto, e doenças das vias urinárias. A espécie é de grande importância na preservação ambiental, na recomposição de mata ciliar, sendo ótima para a recuperação de áreas degradadas (Cravo 1994).

Dentre as técnicas de biologia molecular mais utilizadas nas pesquisas científicas, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), se consolidou por permitir acesso direto à diversidade genética de populações naturais, tanto dentro quanto entre populações, por meio de marcadores moleculares como os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*), os quais são distribuídos por todo o genoma dos eucariotos, sendo bastante utilizados devido ao seu alto conteúdo informativo (Conson et al. 2013).

Os objetivos deste trabalho foram: (i) investigar, por meio de marcadores microssatélites, o impacto do desflorestamento e fragmentação em três populações jovens e sete populações adultas de *C. xanthocarpa* no Estado do Paraná; (ii) estimar a diversidade genética e a estruturação nessas populações; (iii) verificar se elas se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, (iv) averiguar se experimentaram algum efeito de gargalo genético recente; e (v) comparar os parâmetros genéticos analisados entre as populações adultas e jovens.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Coleta Do Material E Extração De DNA

Amostras de folhas de 246 indivíduos de *Campomanesia xanthocarpa* foram coletadas em sete fragmentos do bioma Mata Atlântica (Tabela 1). Em cada fragmento, foram coletados cerca de 30 indivíduos adultos e indivíduos jovens em três dos sete fragmentos. No total, foram amostrados sete fragmentos do estado do Paraná (Tabela 1, Figura 1), dos quais cinco se encontravam em unidades de conservação (Estação Ecológica do Caiuá, Parque Nacional do Iguaçu, Mata São Francisco, Mata dos Godoy e Floresta Nacional de Irati) e os outros (Ortigueira e Ventania) em áreas não protegidas, cercados de fazendas agropastoris. Foram considerados indivíduos adultos aqueles que já iniciaram a fase reprodutiva e os indivíduos jovens, aqueles que não tinham iniciado esta fase. Durante a coleta, manteve-se uma distância mínima de 10 m entre os indivíduos para obtenção de uma maior representatividade genética de cada população. As amostras foram coletadas e acondicionadas em gelo para posterior extração do DNA (Tabela 1).

O DNA total de cada amostra foi extraído segundo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987) com modificações, onde o CTAB foi substituído por MATAB (*Mixed Ayltrimethylammonium Bromide*, Sigma) no tampão de extração. A integridade do DNA foi visualizada em gel de agarose 1%. As amostras de DNA foram quantificadas no Nanodrop (*Thermo Fisher Scientific, USA*) para a verificação da concentração e pureza das mesmas.

Tabela 1 - Localização, tamanho, altitude e formação florestal dos sete fragmentos de Mata Atlântica no estado do Paraná, sul do Brasil, onde foram coletados indivíduos de *Campomanesia xanthocarpa*.

Código	Cidade – Estado (Coordenada geográfica)	Área do fragmento (hectares)	Altitude (m)	N. de indivíduos	Formação Florestal
EEC	Diamante do Norte – PR, Estação Ecológica do Caiuá (22°36'23.20"S, 52°52'24.22"O)	1449	279	29	Floresta Estacional Semidecidual - Aluvial
SFR	Cornélio Procópio – PR, Parque Estadual Mata São Francisco (23°08'18.56"S, 50°34'6.20"O)	832	505	28	Floresta Estacional Semidecidual - Montana
MGO	Londrina – PR, Parque Estadual Mata dos Godoy (23° 26'46.46"S, 51°15'42.83"O)	675	641	30	Floresta Estacional Semidecidual - Montana
ORT	Ortigueira – PR, Distrito de Briolândia (24°3'20.45"S, 50°53'48.65"O)	10	903	19 A + 28 J*	Floresta Ombrófila Mista - Montana
VEN	Ventania – PR, Sítio Invernadinha (24°16'42.98"S, 50°16'28.27"O)	12	946	27 A + 23 J*	Estepe Gramíneo-Lenhosa - Campo Natural
PNI	Céu Azul – PR, Parque Nacional do Iguaçu (25°10'21.98"S, 53°51'20.50"O)	185 262,5	665	13 A + 23 J*	Floresta Estacional Semidecidual - Montana
IRA	Irati – PR, Floresta Nacional de Irati (25°21'26.96"S, 50°33'42.62"O)	3802,4	844	26	Floresta Ombrófila Mista - Montana/Aluvial

* A e J – Indivíduos adultos e jovens.

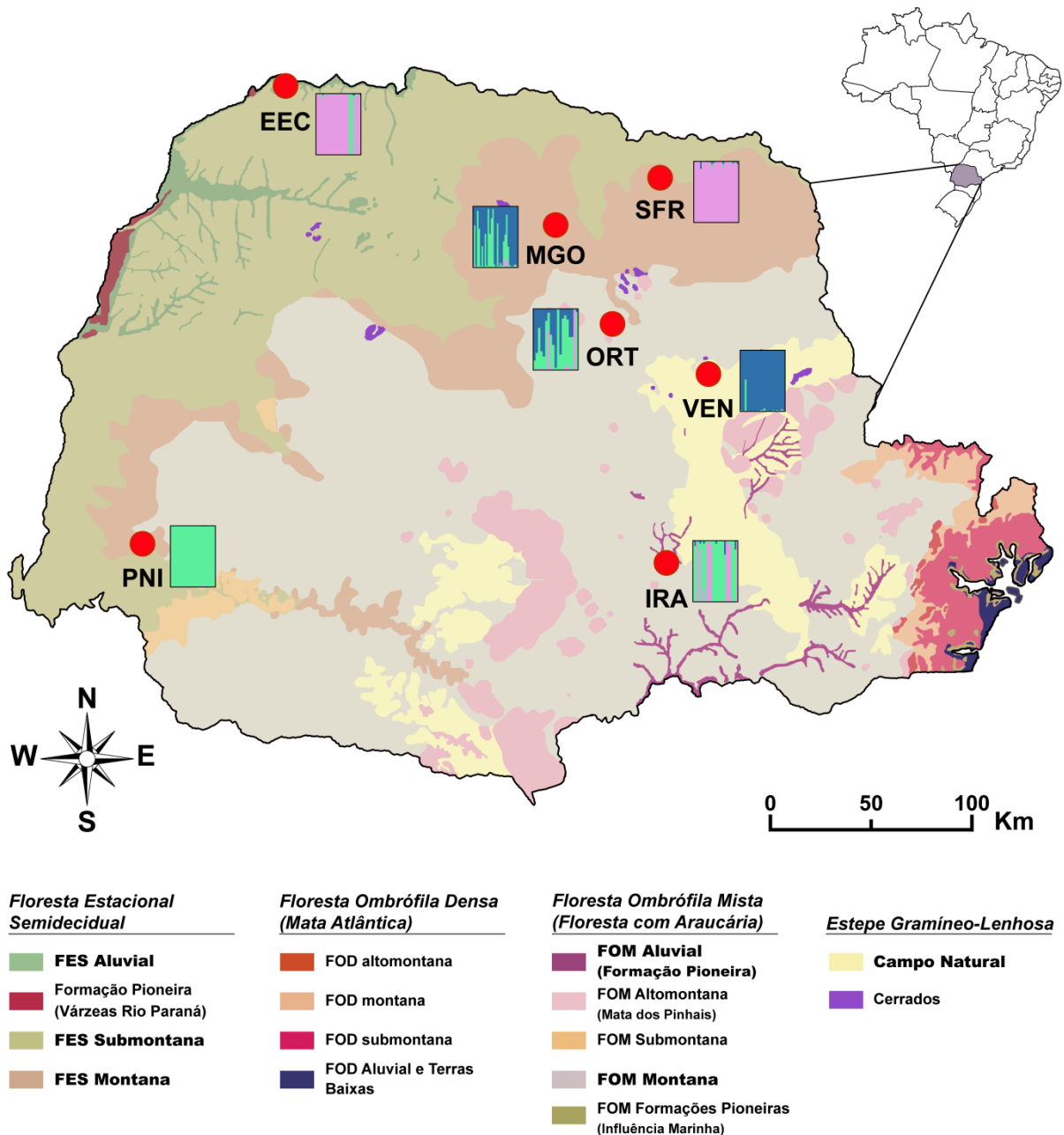


Figura 1 - Localização das sete populações de *Campomanesia xanthocarpa* em fragmentos de Mata Atlântica no estado do Paraná. Agrupamentos genéticos estimados a partir do *software Structure* ao lado das populações. *Abreviações dos nomes dos fragmentos estão detalhados na Tabela 1.

4.4.2 Amplificação Dos Locos De Microsatélites Em Sete Populações De *Campomanesia xanthocarpa*

Dos 10 pares de *primers* descritos para amplificação de locos de microsatélites para *Campomanesia xanthocarpa* (Góes et al. 2019) oito foram utilizados para esta análise, pois apresentaram amplificação satisfatória, sendo, portanto, selecionados para continuar as reações de PCR. A amplificação dos locos

foi conduzida conforme estratégia proposta por Schuelke (2000). Para tanto, foi adicionado na extremidade 5' do *primer* direto uma cauda constituída de 18 nucleotídeos com a sequência M13 (5'- TGTAACGACGGCCAGT-3'). A mesma sequência (M13) foi sintetizada e marcada, para ser usada como sonda, com cada das quatro fluorescências, 6-Fam, Hex, Ned e Pet.

As reações de amplificação foram ajustadas para um volume final de 10 μ L contendo 4,5 μ L de *GoTaq Green Master Mix* (tampão 1x, pH 8,5, 1600 μ M dNTP e MgCl 3 mM; Promega), 0,08 μ L de *primer forward* (5 pM), 0,32 μ L de *primer reverse* (5 pM), e 0,32 μ L de *primer M13* (5 pM), marcado com fluoróforo (6-Fam, Hex, Ned, Pet) (5 pM), 2 μ L de DNA (10 ng) e 2,78 μ L de água livre de nucleases. As condições de temperatura no termociclador foram conduzidas conforme descrito por Góes et al. (2019). Os produtos amplificados dos locos de microssatélite com cada um dos quatro fluoróforos (6-Fam, Hex, Ned, Pet) foram misturados e então diluídos 5 x com água ultrapura. As amostras foram preparadas com um volume total de 10 μ L, sendo 1 μ L da amostra, 0,2 μ L do padrão de peso molecular GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard (*Applied Biosystems*, USA) e 8,8 μ L de formamida HI-DI (*Applied Biosystems*, USA).

As amostras foram submetidas a eletroforese capilar com polímero POP-7™ (*Applied Biosystems*, USA) em sequenciador automático ABI 3500 XL Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, USA). Os eletroferogramas gerados para os dados de microssatélites foram analisados pelo software GeneMarker versão 2.6.3 (*SoftGenetics*, State College, PA, EUA).

4.4.3 Análise Estatística

4.4.3.1 Diversidade e estrutura genética de populações

Para verificar o poder de discriminação dos locos de microssatélites utilizados, uma curva de acumulação genotípica com 1.000 iterações foi realizada e plotada no ambiente R v.3.4.1 (R Core Team 2018) com o pacote "*popp*" (Kamvar et al. 2014; Kamvar et al. 2015).

Os números de alelos (*A*), heterozigosidade observada (*H_o*), heterozigosidade esperada (*H_e*) (diversidade genética; Nei 1987) e coeficiente de endogamia (*F_{is}*) para cada população foram estimados utilizando o pacote *hierfstat*

(Goudet & Jombart 2015) no ambiente R v.3.4.1 (R Core Team 2018). A existência de diferença significativa nos índices de H_o e H_e entre as populações (adultos e jovens) foi verificado pelo teste de Wilcoxon, uma vez que, após o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, as diferenças entre H_o e H_e global das populações não apresentaram uma distribuição normal. Já para testar se houve diferença entre os índices de H_e das populações (adultos e jovens), uma ANOVA de medidas repetidas foi realizada, visto que a distribuição dos valores médios de H_e por locus apresentaram distribuição normal.

A partir das estimativas de frequências alélicas realizadas por meio do pacote *hierfstat*, foi inferido o número de alelos raros (A_r) nas populações, considerando “raros” alelos com frequência $<0,05$. A riqueza alélica (R_a) e a riqueza alélica privada (R_{ap}) foram calculadas pelo software HP-Rare v 1.0 (Kalinowsky 2005), assumindo um nível de significância de 0,05. O HP-Rare utiliza a rarefação de alelos para compensar as diferenças no tamanho amostral, uma vez que, amostras maiores tendem a exibir números mais altos de alelos. O número efetivo de alelos (A_e) em cada loco de microssatélites e população foi calculado usando a versão 1.31 do programa POPGENE (Yeh et al. 1999). O pacote Pegas v 0.8.1 (Paradis 2010), do R v.3.4.1 (R Core Team 2018), foi usado para realizar o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, por loco em todas as populações, sendo a significância do teste verificada pelo método de Monte Carlo baseado com 10.000 permutações. Para verificar o desequilíbrio de ligação entre todos os locos e populações, foi utilizado o teste-G, implementado no software GENEPOP v. 4.0 (Rousset 2008) pelo método de “*log likelihood*”, sendo utilizados os parâmetros padrão da cadeia de Markov (1.000 *step dememorization*, 100 *batches*, e 1,000 *iterations per batch*). A fim de evitar o viés de múltiplos testes de desequilíbrio de ligação, o nível de significância foi corrigido pelo procedimento sequencial de Bonferroni (Rice 1989).

Uma análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) foi realizada para estimar a partição de variância genética dentro e entre as populações de *Campomanesia xanthocarpa* no software Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier et al. 2005). Com base na AMOVA, a diferenciação genética populacional também foi estimada usando índices F_{ST} global e par a par, (Weir & Cockerham 1984), no mesmo software. Uma vez que a presença de alelos nulos pode influenciar a estimativa do F_{ST} através da superestimação, o método ENA (*Excluding Null Alleles*) implementado no software FreeNA (Chapuis & Estoup 2007), foi usado para estimar

a frequência de alelos nulos e valores de F_{ST} a partir de dados corrigidos e não corrigidos para o viés positivo induzido pela presença de alelos nulos na estimativa de F_{ST} . O ParallelStructure 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Besnier & Glover 2013) disponível no portal CIPRES v.3.3 (Miller et al. 2010) foi usado para determinar o número de agrupamentos genéticos (K) nas populações e atribuir indivíduos a esses grupos. Foram realizadas 20 corridas independentes para valores de K entre um e 10, seguindo o modelo de mistura e sem “prior” de localização das populações. Cada corrida teve um *burn-in* de 250.000 iterações na Cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC), seguido por 1.000.000 iterações. O número de clusters foi determinado de acordo com o método de Evanno utilizando a ferramenta *Structure Harvester* (Earl & vanHoldt 2012). Para visualizar as relações entre as populações de *C. xanthocarpa*, uma Neighbor-Net (Bryant & Moulton 2004) foi construída a partir da distância de Prevosti (Prevosti et al. 1975), a qual foi escolhida por sua capacidade de lidar com dados perdidos, onde tais são considerados equivalentes em uma dada comparação (Hansen et al. 2016; Kamvar et al. 2015). A matriz de distância par a par entre indivíduos foi calculada no pacote “*poppr*” (Kamvar et al. 2014; Kamvar et al. 2015) implementado no R v.3.4.1 (R Core Team 2018), e a Neighbor-Net foi construída no software SplitsTree v.4.14.2 (Huson & Bryant 2006). A Análise de Coordenadas Principais foi realizada a partir da distância de Prevosti usando a função “*cmdscale*” no R v.3.4.1 (R Core Team 2018). A correlação entre a diferenciação genética e distância geográfica foi avaliada usando o teste de Mantel implementado por Legendre e Legendre (2012). A matriz de F_{ST} par a par foi construída no Arlequin 3.5.1.3. (Excoffier et al. 2005), enquanto a matriz de distância geográfica foi obtida a partir de coordenadas geográficas. O coeficiente de correlação de Mantel (r) foi calculado pelo método Pearson, usando o pacote VEGAN (Oksanen et al. 2016) implementado em R environment v.3.4.1 (R Core Team 2018), e a significância foi avaliada por meio de 10.000 permutações.

4.4.3.2 Análise demográfica e fluxo gênico

A história demográfica das populações de *C. xanthocarpa*, baseada em locos de microssatélites, foi avaliada utilizando o programa BOTTLENECK v.1.2.02. (Piry et al. 1999). Para isso, foi utilizado o teste estatístico Wilcoxon. Esse teste é mais apropriado e robusto para conjuntos de dados com menos de 20 locos (Piry et al.

1999), e examina se as populações exibem um maior nível de heterozigosidade do que o previsto em uma população em equilíbrio de mutação-deriva. Foram realizadas 1.000 simulações com 95% de mutações em passo único e 5% de mutações em múltiplos passos e uma variância de 12, conforme recomendado por Piry et al. (1999). Apesar do modelo mutacional *Two-Phase Mutational Model* (TPM) ser mais apropriado para dados de microssatélites, o Modelo *Infinite Alleles Model* (IAM) e *Stepwise Mutation Model* (SMM) também foram testados. Os valores de P do teste de Wilcoxon foram usados como evidência para os gargalos e foram avaliados quanto à significância no nível 0,05.

A fim de avaliar o fluxo gênico contemporâneo (nas últimas gerações) e a direção da migração entre as populações, foi utilizada uma abordagem Bayesiana implementada no software *BayesAss* v3 (BA3) (Wilson; Rannala 2003). Para a primeira corrida foram utilizadas configurações padrão e, em corridas subsequentes ajustamos os valores dos parâmetros de mistura MCMC das taxas de migração, frequências alélicas e coeficientes de endogamia para obter as taxas de aceitação recomendadas para mudanças propostas entre as cadeias no final da corrida (entre 40 e 60 % do comprimento total da cadeia) (Wilson; Rannala 2003). Quando a corrida alcançou as mudanças propostas aceitáveis, foi realizado três repetições com 30.000.000 iterações na MCMC com 3.000.000 de iterações descartadas como *burn-in*. A convergência das corridas foi verificada no software Tracer v.1.6 (Rambaut et al. 2014).

Para a comparação entre indivíduos jovens e adultos foram realizadas as mesmas análises, com exceção de taxas de migrantes, F_{ST} par a par e teste de Mantel.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Diversidade e Estrutura Genética

A curva de acumulação genotípica apresentou um platô, o que indica que o número de locos de microssatélites aplicados neste estudo foi suficiente para discriminar 100 % dos genótipos multilocus únicos presentes na amostragem (Figura 2). Para os oito locos de microssatélites utilizados em *C. xanthocarpa*, foi observado um total de 76 alelos em 172 indivíduos adultos analisados em sete fragmentos

amostrados, e para os jovens um total de 25 alelos em 74 indivíduos. Por sua vez, o número de alelos efetivos (A_e) variou de 1,81 para a população EEC a 3,51 para a população de MGO, com média igual a 2,56. Para os indivíduos jovens a média de alelos efetivos (A_e) foi 2,12 alelos, variando de 2,01 (ORT) a 2,34 para a população de plantas de VEN (Tabela 2).

O número de alelos raros (A_r) para as populações adultas variou de 19 (MGO) a 2 (ORT), com uma média de 12,28. Para os jovens, o número de alelos raros variou de 6 (VEN) a 13 (ORT) e uma média de 8,67 (Tabela 2). A média da riqueza alélica (R_a) para os adultos foi de 3,13 alelos, a qual variou de 2,50 para PNI a 3,55 para ORT, enquanto que para os jovens a média foi de 2,96 alelos, variando de 2,77 para PNI a 3,16 alelos para VEN. A riqueza alélica privada (R_{ap}) variou de 0,71 (SFR) a 0,27 (PNI) para as populações adultas, enquanto que, para as populações jovens variou de 0,37 (VEN) a 0,29 (ORT) (Tabela 2).

A heterozigosidade média observada (H_o) global foi significativamente menor do que a heterozigosidade esperada (H_e) global, considerando todos os indivíduos analisados, jovens e adultos (Wilcoxon T test, $V = 1930$, $P = 0,001$). O valor médio de heterozigosidade observada (H_o) foi menor do que a heterozigosidade média esperada (H_e) tanto para populações adultas quanto jovens (adultos: $H_o = 0,37$ e $H_e = 0,47$; jovens $H_o = 0,37$ e $H_e = 0,45$) (Tabela 2). Com exceção das populações adulta de VEN e SFR, todas as outras populações apresentaram H_e menor que H_o , entretanto, somente ORT apresentou uma diferença estatisticamente significativa, de acordo com o teste de Wilcoxon (Wilcoxon T test, $v = 33$, $P = 0,039$) indicando heterozigosidade observada menor do que a esperada. Quando comparada entre todas as populações (jovens e adultos), o H_e não se apresentou estatisticamente diferente (ANOVA de medidas repetidas $F=1,058$, $df = 9$, $P = 0,406$), sendo, portanto, a diversidade genética considerada moderada e igual para todas as populações.

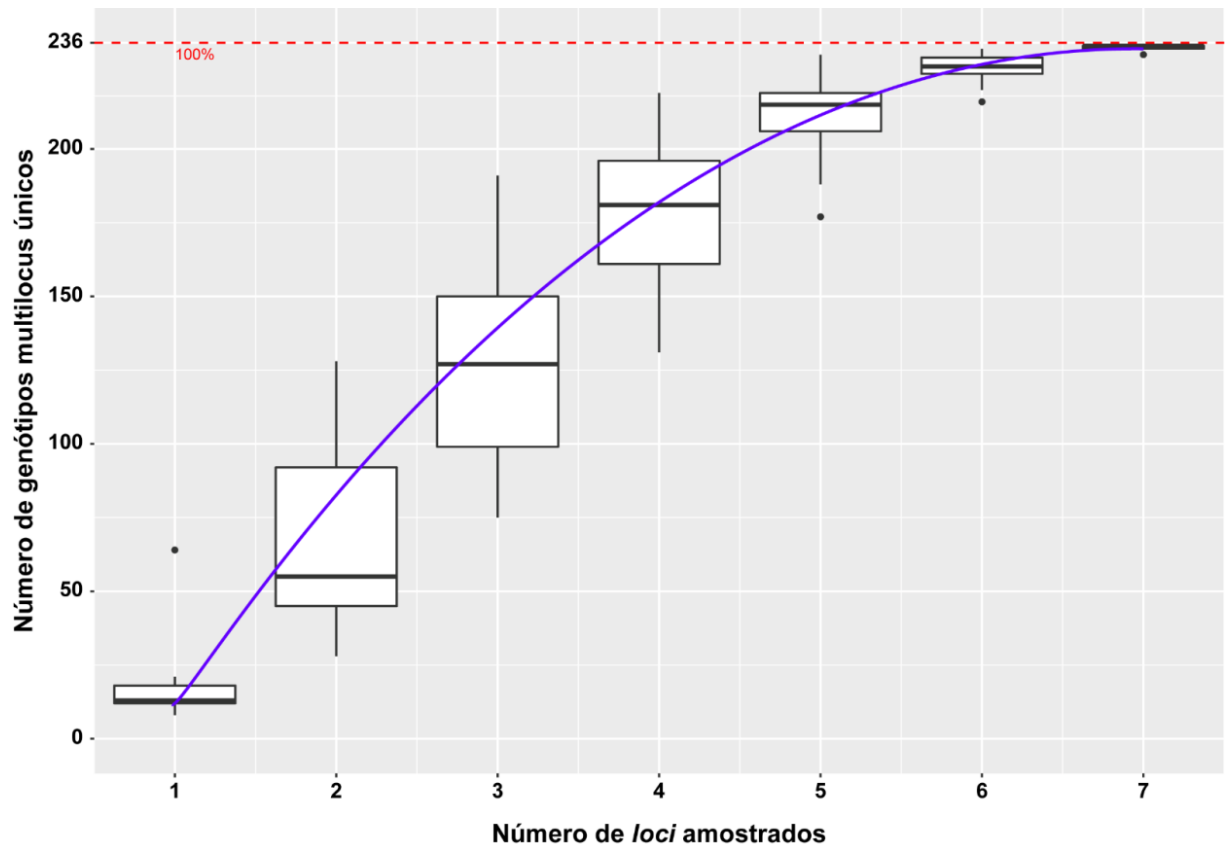


Figura 2 - Curva de acumulação genotípica para oito locos de microssatélites aplicados à sete populações de indivíduos adultos e três populações de indivíduos jovens de *Campomanesia xanthocarpa* amostradas em fragmentos de Mata Atlântica no estado do Paraná. Em azul, a formação de um platô na curva mostra a eficiência dos marcadores utilizados em discriminar os genótipos multilocus únicos da amostragem.

Tabela 2 - Parâmetros intrapopulacionais de diversidade genética de *Campomanesia xanthocarpa*.

Populações	n	A	R _a	A _r	A _e	R _{ap}	H _E	H _O	F _{IS}
Adultos									
EEC	29	38	2,78	18	1,81	0,57	0,41	0,26	0,36 [†]
SFR	28	36	2,91	15	2,37	0,71	0,44	0,46	-0,04
MGO	30	45	3,50	19	3,51	0,65	0,46	0,32	0,30 [†]
ORT	19	33	3,55	2	3,05	0,81	0,52	0,34	0,35 [†]
VEN	27	39	3,47	14	2,71	0,58	0,58	0,60	-0,04
PNI	13	23	2,50	3	1,99	0,27	0,39	0,28	0,29 [†]
IRA	26	38	3,21	15	2,48	0,48	0,50	0,32	0,37 [†]
Média		36	3,13	12,28	2,56	0,58	0,47	0,37	
Jovens									
ORT_J	28	34	2,95	13	2,01	0,29*	0,44	0,39	0,13 [†]
VEN_J	23	32	3,16	6	2,34	0,37*	0,51	0,47	0,09
PNI_J	19	29	2,77	7	2,02	0,46*	0,41	0,26	0,38 [†]
Média		31,67	2,96	8,67	2,12	0,38	0,45	0,37	

n = número de indivíduos por população; A = número de alelos por população; R_a = riqueza alélica; A_r = alelos raros (frequência menor que 5 %); A_e = alelos efetivos; R_{ap} = riqueza alélica privada; H_E = heterozigosidade esperada; H_O = heterozigosidade observada; F_{IS} = coeficiente de endogamia; [†]significativo a 0,05 após correção sequencial de Bonferroni. *Comparação realizada entre adultos e jovens. #Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

Após correção sequencial de Bonferroni, sete das 10 populações (sete adultas e três jovens) apresentaram coeficiente de endogamia (F_{IS}) positivo e significativo, com exceção de SFR (adulto) e VEN (adultos e jovens) (Tabela 2).

A estimativa da presença de alelos nulos, calculada pelo software *FreeNa*, indicou que o loco Cxan27 é a que apresentou maior frequência de alelos nulos para todas as populações, com média de 0,303 para as populações adultas e 0,263 para as populações jovens. O loco com menor frequência de alelos nulos para as populações adultas foi Cxan1 (0,006) e para as populações jovens foi Cxan12 (0,025). De forma geral, as populações com maior presença de alelos nulos foram IRA e EEC, com 0,125 e 0,130, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência de alelos nulos estimada pelo *software* FreeNA para todos os locos e populações de *Campomanesia xanthocarpa* adultas e jovens em fragmentos de Mata Atlântica no estado do Paraná.

	Cxan1	Cxan2	Cxan5	Cxan6	Cxan12	Cxan16	Cxan18	Cxan27	Média
Adultos									
EEC	0,000	0,001	0,173	0,374	0,133	0,000	0,149	0,174	0,125
SFR	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,334	0,041
MGO	0,000	0,000	0,024	0,001	0,123	0,011	0,091	0,384	0,079
ORT	0,000	0,000	0,145	0,099	0,000	0,143	0,106	0,303	0,099
VEN	0,044	0,059	0,076	0,000	0,000	0,000	0,000	0,321	0,062
PNI	0,000	0,000	0,129	0,000	0,000	0,062	0,001	0,314	0,063
IRA	0,000	0,155	0,124	0,188	0,000	0,029	0,251	0,292	0,130
Média	0,006	0,030	0,096	0,095	0,037	0,035	0,085	0,303	
Jovens									
ORT_J	0,000	0,000	0,060	0,094	0,000	0,000	0,072	0,237	0,058
VEN_J	0,136	0,039	0,003	0,000	0,000	0,000	0,043	0,274	0,062
PNI_J	0,000	0,054	0,209	0,000	0,075	0,132	0,001	0,277	0,093
Média	0,045	0,031	0,091	0,031	0,025	0,044	0,038	0,263	

#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

O teste exato para o equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou que algumas populações exibiram locos em desvio significativo do equilíbrio (Figura 3). A população Estação Ecológica do Caiuá adulta apresentou 6 locos em desvio, assim como a população de Ventania adulta e Irati adulta exibiu 5 locos em desvio (Figura 3). Em relação aos jovens, Ortigueira e Ventania apresentaram quatro locos em desvio e Parque Nacional do Iguaçu somente três locos em desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Figura 3).

O teste do equilíbrio de ligação evidenciou que alguns locos estavam associados em desequilíbrio de ligação. A população de Irati apresentou seis pares de locos em desequilíbrio de ligação e a população Estação Ecológica do Caiuá e apresentou cinco pares de locos em desequilíbrio de ligação. A população Mata dos Godoy adulta mostrou somente um par de locos em desequilíbrio, enquanto que o restante das populações adultas não apresentou pares de locos associados em desequilíbrio de ligação. Em relação aos indivíduos jovens, a população de Ortigueira apresentou três pares de locos em desequilíbrio, seguido por Ventania com dois locos em desequilíbrio e, por fim, Parque Nacional do Iguaçu com apenas

um loco associado em desequilíbrio de ligação (Tabela 4). Após a correção sequencial de Bonferroni, somente a população de Irati apresentou três pares de locos em desequilíbrio de ligação (Tabela 4).

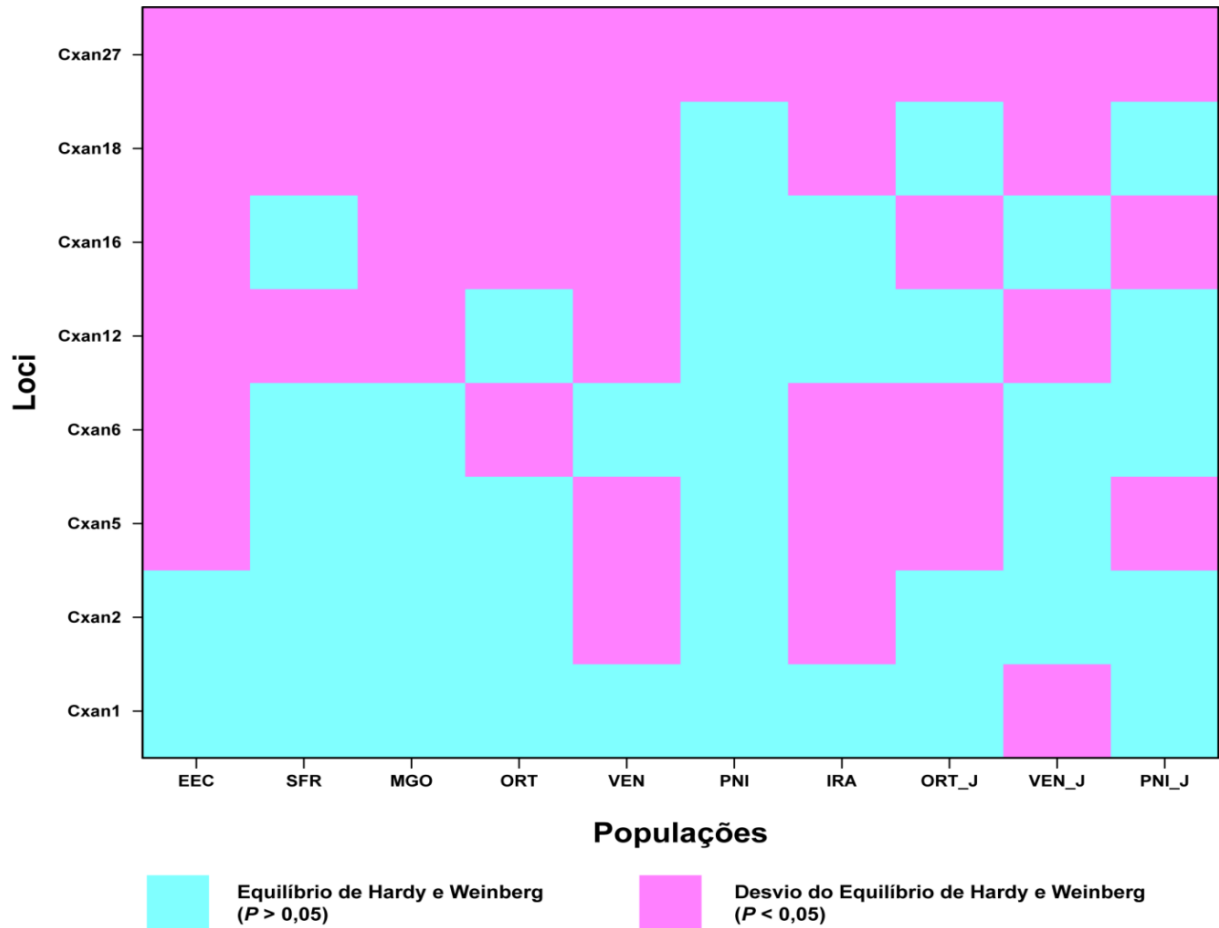


Figura 3 - Representação gráfica para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os locos de SSR amplificados nas sete populações de indivíduos adultos e três populações de indivíduos jovens de *Campomanesia xanthocarpa* em fragmentos de Mata Atlântica no estado do Paraná. #Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

Tabela 4 - Presença de desequilíbrio de ligação para oito locos de microssatélites (C_{xan}) em populações de *Campomanesia xanthocarpa* em fragmentos de Mata Atlântica no estado do Paraná.

	EEC	SFR	MGO	ORT	VEN	PNI	IRA	ORT_J	VEN_J	PNI_J
Locos associados em DL*	Adultos					Jovens				
C _{xan} 1/ C _{xan} 2										
C _{xan} 1/ C _{xan} 5										
C _{xan} 1/ C _{xan} 6										
C _{xan} 1/ C _{xan} 12	+								+	
C _{xan} 1/ C _{xan} 16									+	
C _{xan} 1/ C _{xan} 18										
C _{xan} 1/ C _{xan} 27										
C _{xan} 2/ C _{xan} 5										
C _{xan} 2/ C _{xan} 6										
C _{xan} 2/ C _{xan} 12										
C _{xan} 2/ C _{xan} 16										
C _{xan} 2/ C _{xan} 18										
C _{xan} 2/ C _{xan} 27										
C _{xan} 5/ C _{xan} 6										
C _{xan} 5/ C _{xan} 12							+			
C _{xan} 5/ C _{xan} 16	+		+							+
C _{xan} 5/ C _{xan} 18	+						+	+		
C _{xan} 5/ C _{xan} 27										
C _{xan} 6/ C _{xan} 12							+	+		
C _{xan} 6/ C _{xan} 16										
C _{xan} 6/ C _{xan} 18	+									
C _{xan} 6/ C _{xan} 27	+									
C _{xan} 12/ C _{xan} 16							+			
C _{xan} 12/ C _{xan} 18							+			
C _{xan} 12/ C _{xan} 27								+		
C _{xan} 16/ C _{xan} 18							+			
C _{xan} 16/ C _{xan} 27										
C _{xan} 18/ C _{xan} 27										

“+” são significativos a um alfa de 0,05. “+” pares de locos em desequilíbrio de ligação após correção sequencial de Bonferroni (nível indicativo de ajuste nominal para *P*-valor = 0,001). # Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

A análise da variância molecular (AMOVA) para os adultos mostrou que 73,23 % da variação encontra-se dentro de populações e 26,77 % entre populações, com um F_{ST} de 0,27. Para os indivíduos jovens a maior parte da variação também se mostrou dentro de populações, com um F_{ST} de 0,01 (Tabela 5). Considerando a correção para a exclusão de alelos nulos, o F_{ST} global estimado para adultos foi de 0,26, desta forma, não houve diferença significativa entre o F_{ST} global estimado com e sem correção, tanto para adultos quanto para jovens (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise de variância molecular (AMOVA) de populações de *Campomanesia xanthocarpa*. Variação genética entre e dentro de populações e entre e dentro de populações adultas e seus respectivos jovens.

Fonte da variação	g.l.	SQ	CV	PV (%)	F_{ST}	$F_{ST}ENA$	IC
Adultos							
Entre populações	6	41,18	0,13	26,77*	0,27*	0,26	0,152 - 0,371
Dentro das populações	337	123,04	0,36	73,23			
Adultos X Jovens							
Entre populações	1	1,06	0,00	0,94	0,01	0,00	(-0,003) - 0,005
Dentro das populações	256	122,60	0,48	99,06			

g.l. = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; CV = componentes da variação; PV (%) = percentual de variação; F_{ST} = índice de fixação; $F_{ST}ENA$ = índice de fixação corrigido para a presença de alelos nulos. IC = intervalo de confiança para o $F_{ST}ENA$ baseado em 10.000 replicatas de *bootstrap*. * $P < 0,01$ (teste de significância com 10.100 permutações).

Por meio dos dados de F_{ST} par a par foi observado que as populações apresentaram nível de diferenciação genética de moderado a alto, sendo a menor diferença observada entre as populações de Ortigueira e Mata dos Godoy e a maior diferenciação genética entre as populações de Estação Ecológica do Caiuá e Parque Nacional do Iguaçu (Tabela 6).

O teste de Mantel, aplicado para testar correlação entre as distâncias geográficas e os valores de diferenciação genética (F_{ST} par a par), apresentou correlação positiva, porém não significativa estatisticamente ($r = 0,46$; $P = 0,05$) (Figura 4).

Tabela 6 - Distâncias entre populações de *Campomanesia xanthocarpa* baseadas em oito locos de microssatélites. Valores de diferenciação genética (F_{ST}) entre pares acima da diagonal e distâncias geográficas (Km) abaixo da diagonal.

Populações	EEC	SFR	MGO	ORT	VEN	PNI	IRA
EEC		0,10*	0,45*	0,40*	0,40*	0,58*	0,20*
SFR	190		0,40*	0,32*	0,31*	0,47*	0,18*
MGO	149	74,2		0,02	0,11*	0,04	0,11*
ORT	219	105	74,4		0,13*	0,15*	0,03
VEN	282	127	132	68		0,24*	0,12*
PNI	331	401	314	313	368		0,22*
IRA	348	250	223	157	143	306	

* $P < 0,01$ (teste de significância com 10.100 permutações). #Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

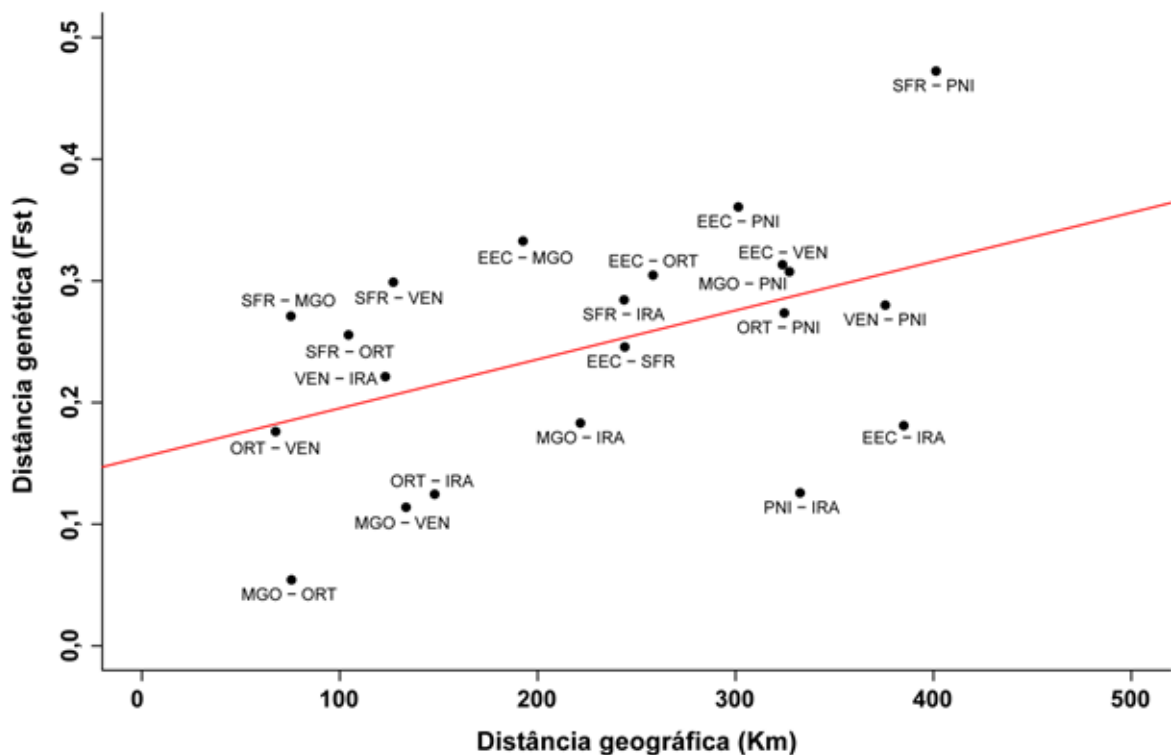


Figura 4 - Correlação entre a distância genética (F_{ST}) e distância geográfica (Km) de sete populações de *Campomanesia xanthocarpa* ($r = 0,46$; $P = 0,05$). Análise realizada pelo teste de Mantel por meio do método "Pearson" no R. #Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

A estimativa bayesiana de fluxo gênico indicou que na maioria das populações, quase toda diversidade genética resulta de indivíduos não migrantes. As populações que contribuíram com a maior taxa de migrantes foi IRA para PNI (23,3%) e MGO para ORT (21,9%) (Tabela 7).

Tabela 7 - Estimativas das taxas médias de fluxo gênico contemporâneo entre as sete populações de *Campomanesia xanthocarpa*. A proporção de não migrantes se encontra na diagonal, em negrito.

Destino do fluxo gênico	Origem do fluxo gênico						
	EEC	SFR	MGO	ORT	VEN	PNI	IRA
EEC	0,917	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,037
SFR	0,011	0,941	0,010	0,009	0,010	0,010	0,010
MGO	0,009	0,009	0,906	0,009	0,047	0,009	0,010
ORT	0,014	0,029	0,219	0,681	0,017	0,015	0,026
VEM	0,010	0,010	0,020	0,010	0,929	0,010	0,011
PNI	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	0,683	0,233
IRA	0,084	0,022	0,020	0,011	0,010	0,010	0,843

#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

A análise realizada pelo *Bottleneck* não forneceu indicativos para possíveis reduções recentes no tamanho populacional efetivo das populações em nenhum dos modelos (IAM, TPM e SSM) (Tabela 8).

Tabela 8 - *P*-valores do teste de Wilcoxon para eventos de gargalo genético realizado a partir de oito locos de microssatélites em sete populações de *Campomanesia xanthocarpa*.

	IAM ^a	TPM ^b	SMM ^c
	Adultos		
EEC	0,973	0,996	0,996
SFR	0,629	0,973	0,986
MGO	0,406	0,973	0,973
ORT	0,125	0,578	0,680
VEN	0,191	0,578	0,629
PNI	0,234	0,813	0,813
IRA	0,527	0,973	0,980
	Jovens		
ORT_J	0,844	0,994	0,994
VEN_J	0,473	0,844	0,963
PNI_J	0,656	0,945	0,945

^a = modelo evolutivo *Infinite Allele Model*; ^b = modelo evolutivo *Two-Phase Mutational Model*; ^c = modelo evolutivo *Stepwise Mutation Model*. Valores não significativos ($\alpha = 0,05$). # Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

Na análise de agrupamentos bayesianos realizada para os dados de microssatélite em indivíduos adultos e jovens, o *K* mais provável foi *K*=2, porém, o segundo melhor valor de delta *K* foi *K*=3 (Figura 5).

Nos dois casos a representação gráfica que melhor explica a estruturação dos grupos, tanto para as populações de adultos (Figura 6) quanto para as populações jovens (Figura 7) é *K*=3. Para os adultos foi formado um *cluster* composto pelas populações de EEC e SFR; um segundo *cluster* de MGO, ORT e VEN, de forma que Ventania é a população mais homogênea dentro deste grupo, pois tanto em MGO como em ORT há uma representação genética de amostras do terceiro *cluster*. Por fim, o terceiro agrupamento é composto pelas populações de PNI e IRA. Neste agrupamento, PNI também se mostrou um grupo bem homogêneo, enquanto que IRA exibiu representantes do primeiro e do terceiro *cluster* (Figura 6). Para a comparação entre as populações com exemplares adultos e jovens, formou-se três grupos bem definidos: um primeiro *cluster* com a população de ORT adulto e jovem, com alguns representantes do segundo e terceiro *cluster*; o segundo *cluster* com VEN adultos e jovens, também exibiu alguns exemplares do primeiro e terceiro

cluster, o último grupo genético foi formado por PNI adultos e jovens, com os indivíduos adultos novamente homogêneos e os jovens apresentando representantes do primeiro e segundo *cluster* (Figura 7).

A Neighbor-Net construída no software *SplitsTree* a partir da distância de Prevosti exibiu uma estruturação genética clara para as populações amostradas, tanto para os indivíduos adultos (Figura 8), quanto para adultos e seus respectivos jovens (Figura 9). Os dados da Neighbor-Net corroboram os dados apresentados pelo *Structure*.

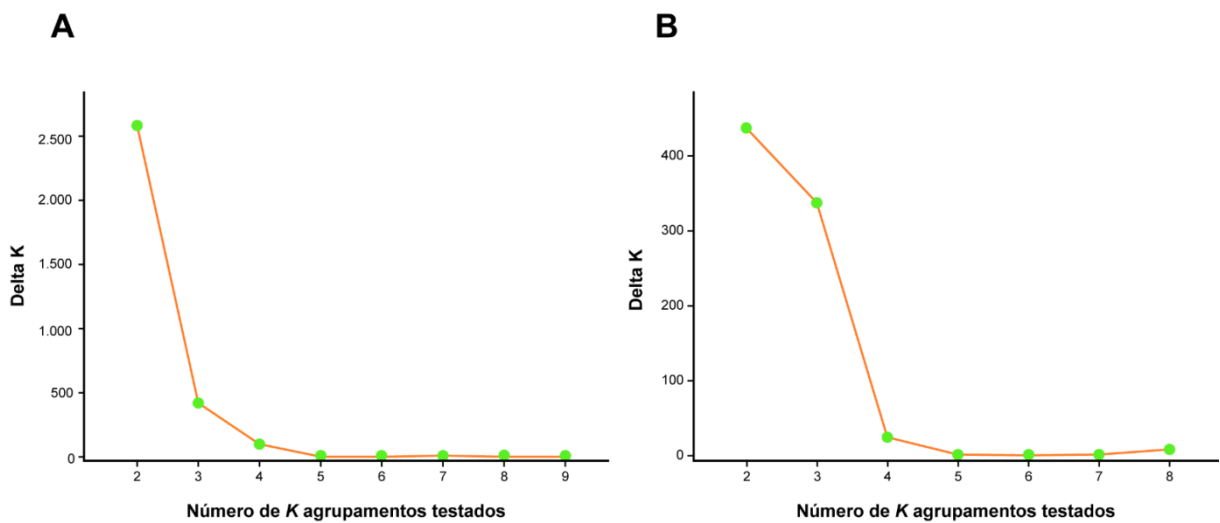


Figura 5 - Valores de Delta K (ΔK) estimados pelo *Structure Harvester* para as análises de agrupamento Bayesiano (*Structure*) de populações de *Campomanesia xanthocarpa* em fragmentos de Mata Atlântica no estado do Paraná. A) Delta K para sete populações de indivíduos adultos. B) Delta K para três populações de indivíduos adultos e jovens.

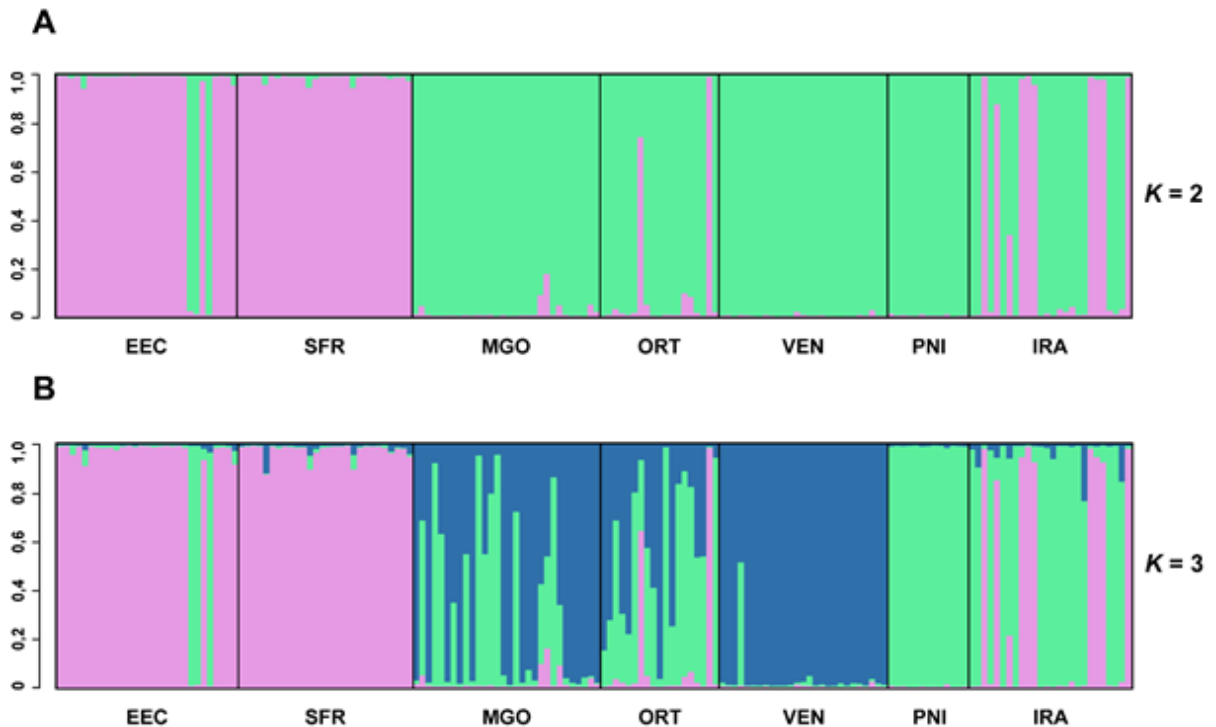


Figura 6 - Análise de agrupamento Bayesiano para indivíduos adultos de sete populações de *Campomanesia xanthocarpa* a partir de marcadores SSR. A) *Bar plot* de $K = 2$, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 2583.466875$) como número ótimo de K agrupamentos. B) *Bar plot* de $K = 3$, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 419.558145$) como segundo melhor número de K agrupamentos. #Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

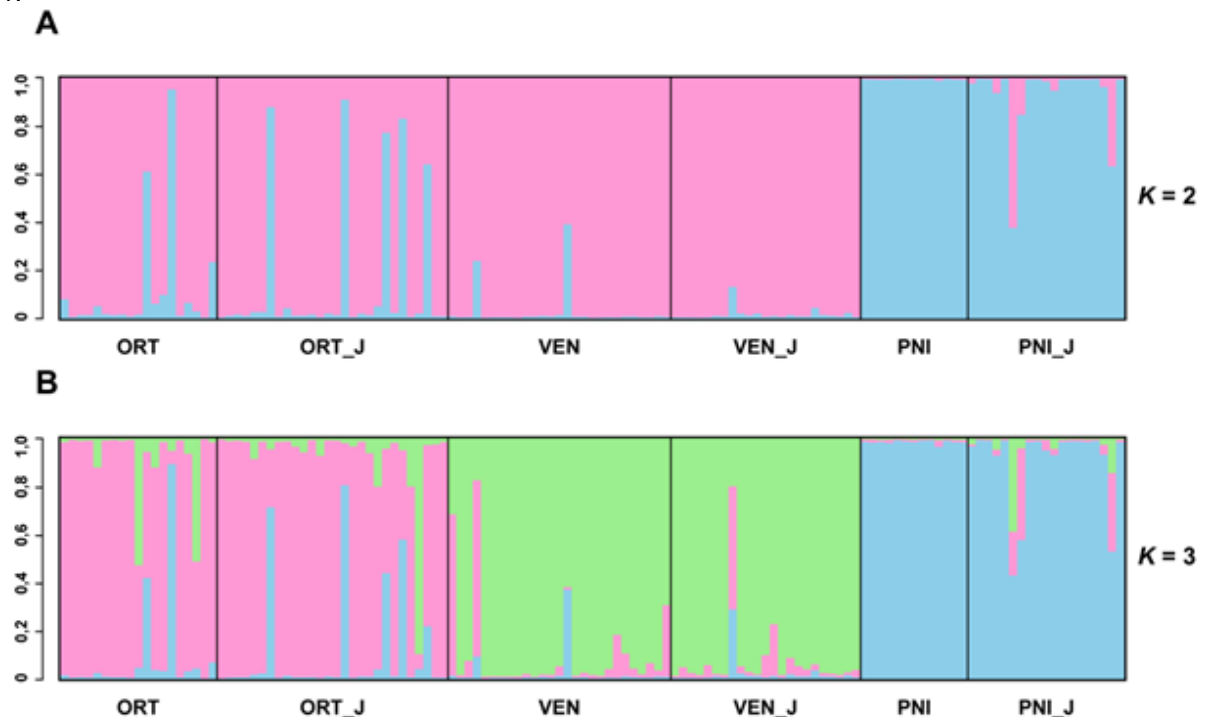


Figura 7 - Análise de agrupamento Bayesiano para indivíduos adultos (_A) e jovens (_J) de três populações de *Campomanesia xanthocarpa* a partir de marcadores SSR. A) *Bar plot* de $K = 2$, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 437.438713$) como número ótimo de K agrupamentos. B) *Bar plot* de $K = 3$, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 337.564769$) como segundo melhor número de K agrupamentos. #Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

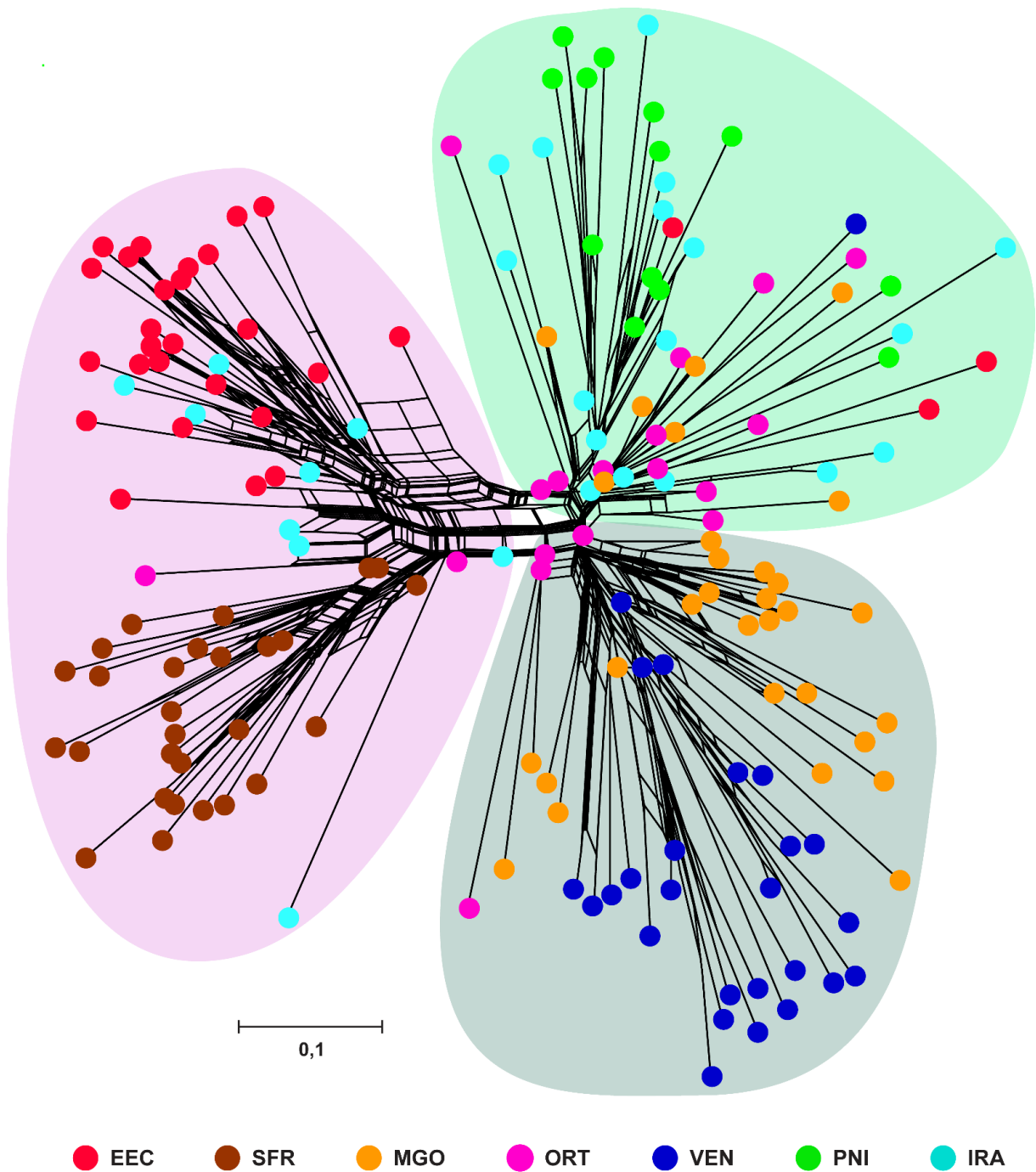


Figura 8 - *Neighbor-Net* baseada em oito locos de SSR e inferida pelo software *SplitsTree* mostrando as relações filogenéticas entre sete populações de indivíduos adultos de *Campomanesia xanthocarpa*, a partir da distância de Prevosti. Cores de fundo codificadas de acordo como os três grupos genéticos designados pelo software *Structure*. # Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

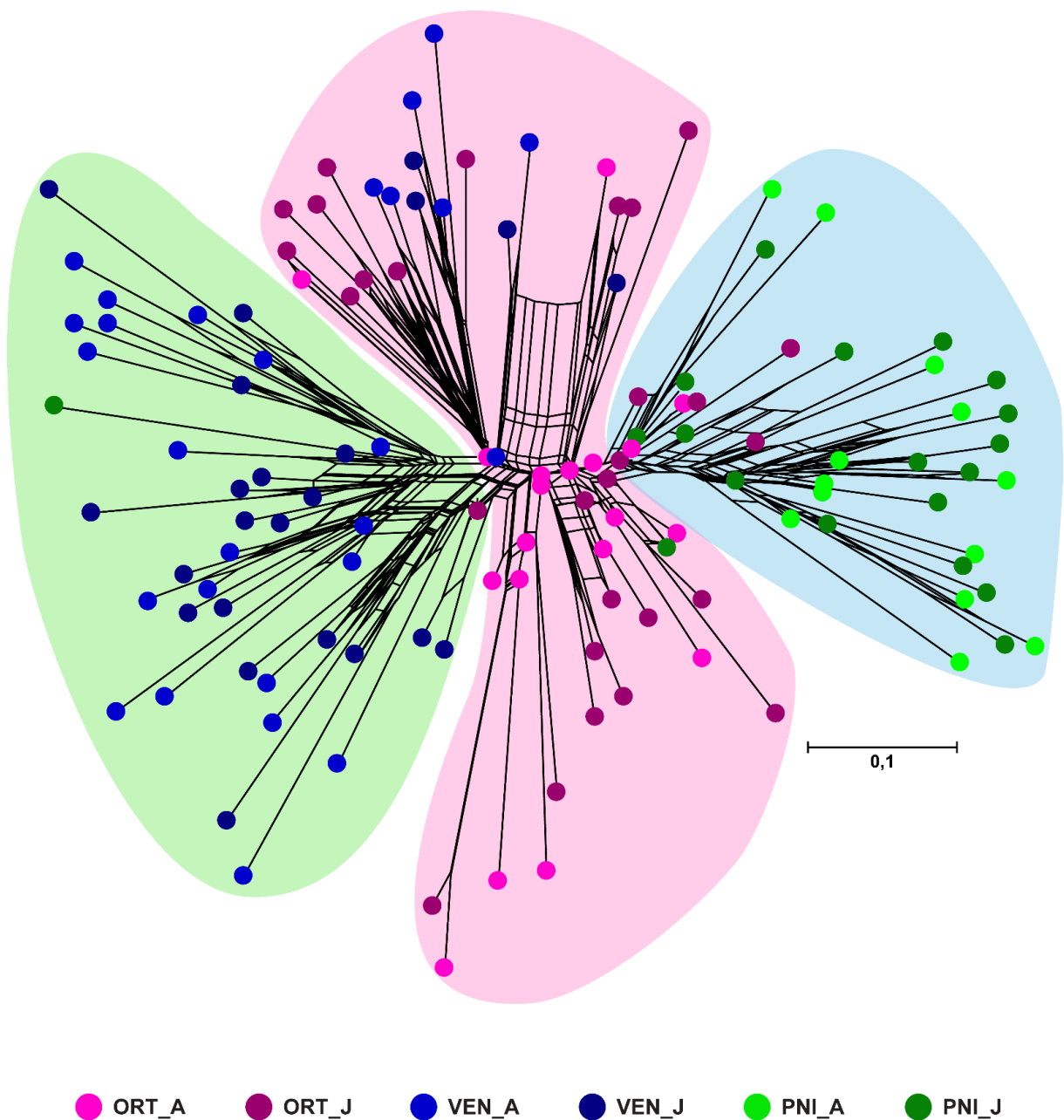


Figura 9 - Neighbor-Net baseada em oito locos de SSR e inferida pelo software *SplitsTree* mostrando as relações filogenéticas entre três populações de indivíduos adultos (_A) e jovens (_J) de *Campomanesia xanthocarpa*, a partir da distância de Prevosti. Cores de fundo codificadas de acordo como os três grupos genéticos designados pelo software *Structure*. #Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

A Análise da Coordenada Principal (PCoA) inferida a partir da distância de Prevosti, indicou a formação de três grupos com a mesma conformação apresentados pelos dados da Neighbor-Net e do *Structure*, para os indivíduos adultos (Figura 10) e para os adultos e seus respectivos jovens (Figura 11).

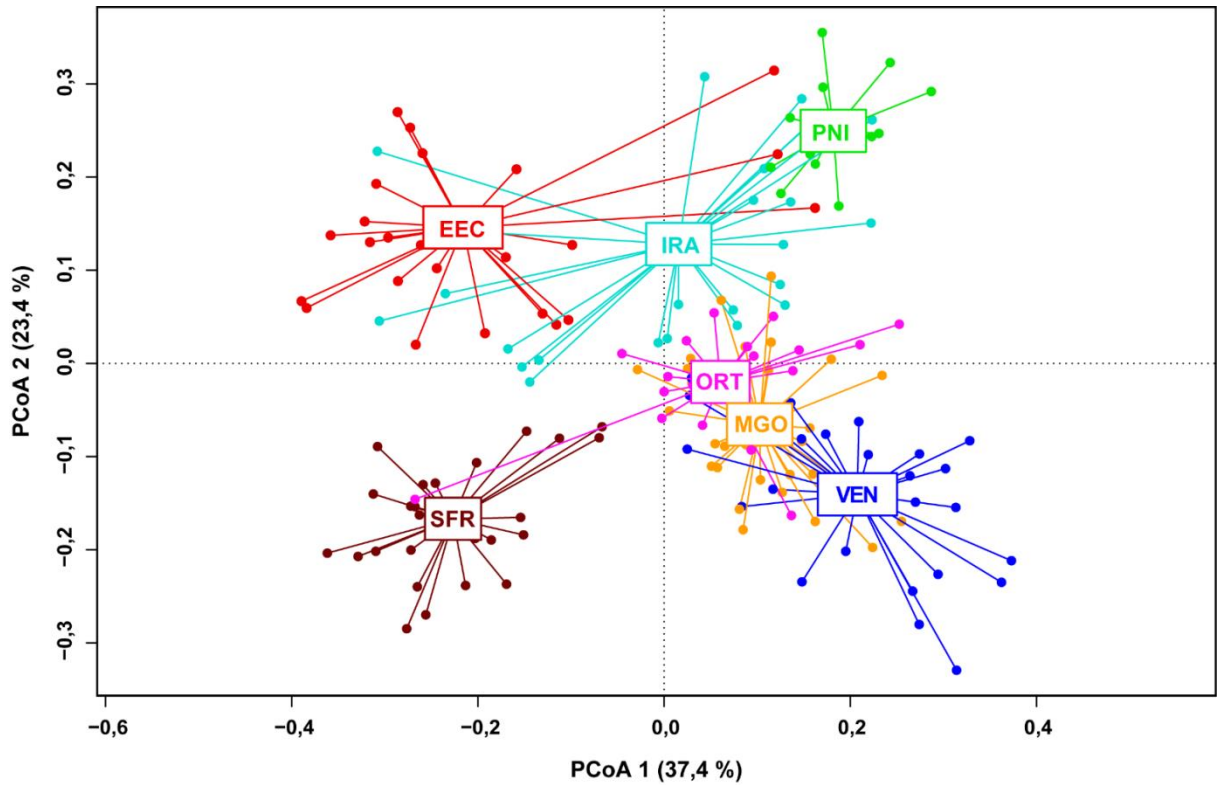


Figura 10 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA), inferida a partir da distância de Prevosti, para sete populações de indivíduos adultos de *Campomanesia xanthocarpa*. # Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

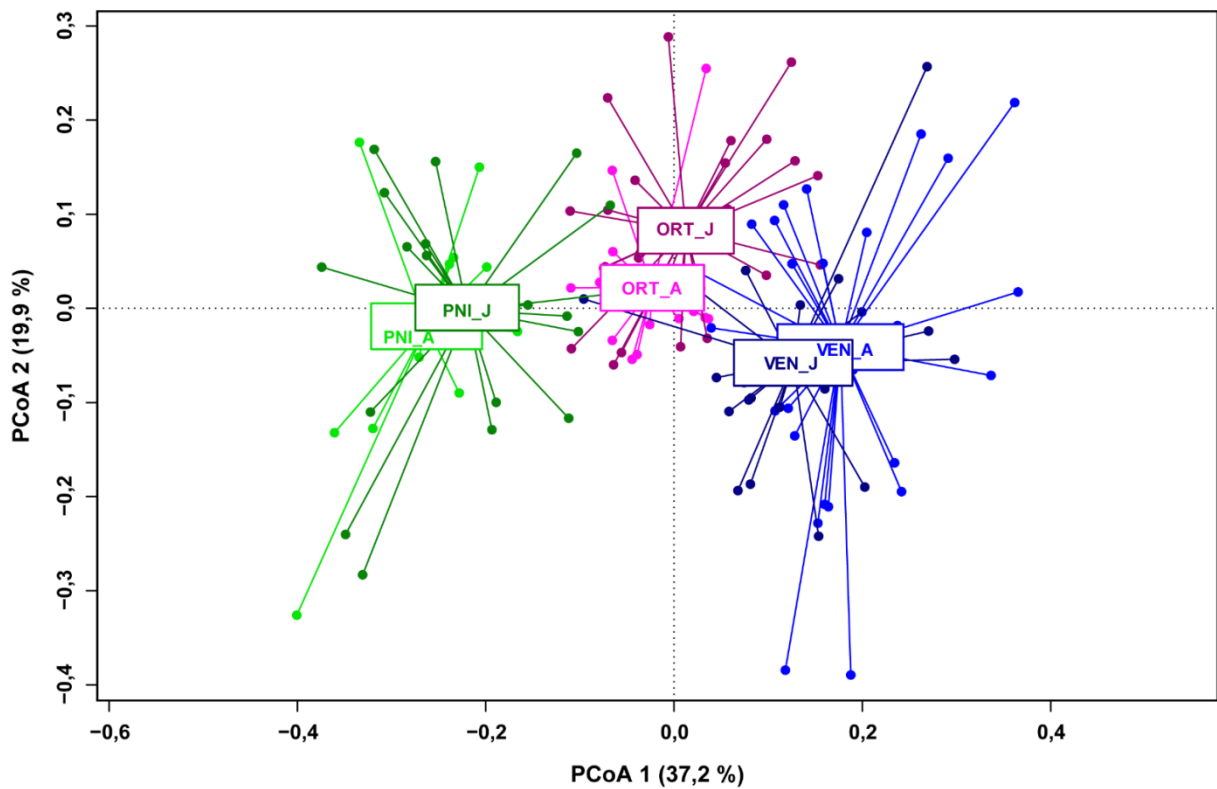


Figura 11 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA), inferida a partir da distância de Prevosti, para três populações de indivíduos adultos (_A) e jovens (_J) de *Campomanesia xanthocarpa*. # Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 1.

4.6 DISCUSSÃO

4.6.1 Diversidade Genética Em *Campomanesia xanthocarpa*

Devido a natureza co-dominante dos marcadores microssatélites, o que os torna amplamente utilizados em genotipagem de plantas, por serem multialélicos, altamente informativos, ocorrerem com frequência relativamente alta e apresentarem boa cobertura do genoma, além de serem reprodutíveis e passíveis de serem transferidos entre espécies, os SSR são excelentes marcadores para se estimar a diversidade e estrutura genética de populações (Ahmad et al. 2018; Powell et al. 1996). Neste trabalho, apresentamos pela primeira vez dados sobre a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *C. xanthocarpa*. A curva de acumulação genotípica (Figura 2) mostrou a capacidade dos marcadores SSR aqui utilizados em discriminar com sucesso todas as amostras incluídas no estudo, indicando que o número de marcadores aplicados foi adequado para capturar a diversidade e a estrutura genética das populações analisadas.

Os níveis de diversidade genética das populações são fundamentais na sustentação adaptativo/evolutivo de uma espécie (Frankham et al. 2008). O estudo dos oito locos de microssatélite nas sete populações adultas de *C. xanthocarpa* apresentou níveis moderados de diversidade genética. A média de alelos por população foi superior ao encontrado em outros estudos ($A = 36$) (Tabela 2), porém, a média de alelos efetivos (A_e) por população foi inferior ao encontrado em outras espécies nativas como *Copaifera langsdorffii* ($A_e = 8,97$; Carvalho et al. 2010) e *Chrysophyllum gonocarpum* ($A_e = 3,64$; Rodrigues 2014). A diferença no número de alelos efetivos (A_e) e no número médio de alelos (A), segundo Carvalho et al. (2010), é devido a presença de alelos raros (frequência $\leq 0,05$).

Os alelos raros estão presentes em todas as populações, sendo em maior número na população de MGO e em menor número nas populações de ORT e PNI (Tabela 2). A presença de alelos raros e exclusivos nas populações analisadas pode ser resultado direto do processo de fragmentação florestal. De acordo com Gandara e Kageyama (1998), as oscilações nas frequências alélicas são frequentemente observadas em populações pequenas, devido ao efeito da deriva genética, o que pode ocasionar a perda e fixação de alelos. Segundo Maksylewicz e Baransk (2013)

a identificação e quantificação de alelos raros e privados nas populações é de suma importância para estratégias de conservação.

As medidas de riqueza alélica, como um componente da diversidade genética, também fornecem subsídios para a escolha de quais populações devem ser priorizadas nos programas de manejo e conservação (Melo et al. 2015). Neste estudo, a população que apresentou maiores índices de alelos raros ($A_r = 19$) foi MGO, enquanto que ORT adulta apresentou os maiores índices de riqueza alélica ($R_a = 3,55$) e riqueza alélica privada ($R_{ap} = 0,81$) (Tabela 2). De acordo com Montagna et al. (2012) alelos exclusivos podem indicar populações e áreas prioritárias para conservação, tendo em vista a maximização da diversidade genética sob proteção, assim, ainda que MGO se encontre em um área de conservação, a população de ORT não se encontra, e portanto, essa deveria ser priorizada em futuros estabelecimentos de áreas de conservação no Estado do Paraná, devido a sua maior riqueza alélica e riqueza alélica privada.

A média da heterozigosidade observada para os indivíduos adultos ($H_o = 0,37$) foi levemente menor que a heterozigosidade esperada ($H_e = 0,47$) (Tabela 2). Entretanto, apenas ORT apresentou diferença estatisticamente significativa, de acordo com o teste de Wilcoxon (Wilcoxon T test, $v = 33$, $p = 0,039$). Em outras espécies da família Myrtaceae foram encontrados resultados semelhantes para a análise de diversidade, *Eugenia dysenterica* ($H_e = 0,44$, Zucchi et al. 2003), *Eucalyptus nitens* ($H_e = 0,58$, Byrne et al. 2000), *Campomanesia phaea* ($H_e = 0,57$, Moreira 2017), porém, quando comparado com outras espécies arbóreas nativas, *Metrodorea nigra* ($H_e = 0,77$, Moraes-Filho 2014) e *Cariniana estrellensis* ($H_e = 0,61$, Guidugli 2016), a diversidade genética foi inferior. Considerando a importância do fluxo gênico em diminuir as diferenças entre as populações e aumentar a diversidade genética dentro das populações (Allendorf et al. 2012), os resultados aqui apresentados sugerem uma possível relação entre as limitações no fluxo gênico e a diversidade genética moderada. Populações que se encontram isoladas ou que apresentam baixos níveis de fluxo gênico são mais suscetíveis aos efeitos da deriva genética e da endogamia, fatores que geralmente resultam na diminuição da diversidade genética (Frankham et al. 2008; Hartl & Clark 2007). Também, as mudanças populacionais associadas a degradação do habitat levam a uma erosão da diversidade genética e aumento da divergência genética entre as populações,

devido ao aumento da deriva e taxa de endocruzamento (Lowe et al. 2005), fato que está na iminência de acontecer nas populações de *C. xanthocarpa*.

O teste de significância para diferença entre as heterozigosidades observada e esperada globais nas populações indicou que há uma diferença estatística significativa entre H_o e H_e , ou seja, pode indicar desvio nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg para toda área amostrada. As populações de EEC, VEN adulta e IRA foram as que apresentaram maior número de locos em desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Figura 3), entretanto, dessas três, apenas EEC e IRA apresentaram F_{IS} (coeficiente de endogamia) positivo e significativo estatisticamente, evidenciando um excesso de homozigotos, que provavelmente está indicando um processo de endogamia (Carvalho et al. 2010; Conson et al. 2013). Em relação a população de VEN adulta, apesar de ter seis dos oito locos em desvio do EHW, não apresentou F_{IS} significativo, o que pode ser devido a forma como estes testes são realizados, uma vez que, o cálculo do F_{IS} leva em conta o H_o e H_e médio das populações, enquanto que o teste do EHW é realizado loco por loco. Como a população de VEN adulta apresentou três locos com excesso de homozigotos, três locos com déficit de homozigotos e dois locos em EHW, as proporções entre os locos com excesso de heterozigotos e excesso de homozigotos equilibraram o coeficiente de endogamia, não o diferindo de 0.

Os parâmetros de diversidade genética nos indivíduos jovens tiveram médias relativamente menores quando comparados com suas respectivas populações adultas (Tabela 2), porém, não diferiram de forma significativa em relação aos indivíduos adultos (ANOVA de medidas repetidas $F = 1,058$, $df = 9$, $P = 0,406$). Com exceção da população VEN jovem, assim como sua respectiva população adulta, as outras duas populações jovens também apresentaram F_{IS} positivo e significativo, indicando um provável processo de endogamia nessas populações jovens. Lowe et al. (2005) revisaram diversos estudos de arbóreas tropicais e para a maioria não encontraram efeito sobre a diversidade genética logo após a fragmentação, mas observaram que endogamia, processo reprodutivo e aptidão foram impactados na geração de progênies, fato que também é observado no presente estudo, onde, ainda que a diversidade genética seja moderada, as populações apresentam excesso de homozigotos.

Segundo Lowe et al. (2005), quando ocorre mudanças na densidade populacional e na dispersão, devido, por exemplo, à perda de insetos polinizadores,

as quais podem estar ligadas às consequências ecológicas da degradação do ambiente, o aumento da endogamia é um dos principais resultados potencialmente prejudiciais da fragmentação florestal. O aumento da endogamia redistribui a variação alélica individual reduzindo a proporção de heterozigosidade. A baixa heterozigosidade observada em algumas espécies tropicais pode ser resultado do sistema de reprodução com aumento da endogamia biparental, autofecundação, estrutura genética espacial (Clevatti et al. 2001) ou redução do tamanho populacional efetivo (Rodrigues 2014). *Campomanesia xanthocarpa* apresenta autoincompatibilidade homomórfica gametofítica, desta forma, exclui a possibilidade de que o excesso de homozigoto nessas populações seja devido à autofecundação. A redução de insetos polinizadores conjuntamente com a fragmentação dos habitats podem ser a causa da endogamia observada nas populações, visto que, todas as populações foram coletadas em áreas cercadas por fazendas agropastoris e, com exceção da população PNI, todas se encontravam em fragmentos de mata reduzidos, aumentando o isolamento entre as populações. *Campomanesia xanthocarpa* é polinizada por abelhas (Santos 2015), que, de acordo com Monquero e Oliveira (2018) vêm declinando com a ação antrópica, devido a introdução de espécies exóticas no monocultivo, ao desmatamento e ao uso excessivo ou incorreto de defensivos agrícolas. Isso, somado ao isolamento geográfico das populações, causado pela fragmentação, compromete a atividade dos polinizadores reduzindo a densidade de recursos alimentares disponíveis e aumentando a distância entre esses recursos, o que tende a aumentar a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados (Serrote et al. 2016).

Lowe et al. (2005) demonstraram que o aumento nas taxas de endogamia é um dos principais fatores deletérios sendo resultado direto da degradação do habitat e os efeitos do processo de endogamia são observados imediatamente após devastação. Tais resultados são consistentes com os nossos, pois a fragmentação do bioma Mata Atlântica, derivada de ciclos recorrentes de corte seletivo e queima pode ser considerada o principal fator responsável pelo excesso de homozigotos observados nas populações de *C. xanthocarpa*.

Os alelos nulos foram observados em todos os locos de microssatélite para *C. xanthocarpa* (Tabela 3), porém em uma baixa frequência, como encontrado por outros autores (Chapuis & Estoup 2007; Dakin & Avise 2004), a não ser pelo loco Cxan 27, que apresentou valores altos. Alelos nulos ocorrem principalmente devido

a uma mutação nos sítios de anelamento dos iniciadores (*primers*) que impedem a amplificação de um dos alelos (Dewoody et al. 2006) e, portanto, não são detectados quando os indivíduos são genotipados. A consequência é a detecção errônea de quantidade maior de genótipos homozigóticos em populações avaliadas por locos microssatélites (Martins et al. 2008) e podem causar desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), levando a conclusões erradas sobre a diversidade genética das populações. Entretanto, a frequência dos alelos nulos nas populações de *C. xanthocarpa* foi baixa e não houve diferenças significativas entre os valores de F_{ST} global com correção para alelos nulos e o valor estimado sem correção, indicando que presença de alelos nulos não é um fator significativo que afeta o nível de diferenciação genética entre as populações (Tabela 5). Visto isso, é mais provável que a taxa de homozigotos encontrados na maioria das populações de *C. xanthocarpa* seja resultado de cortes seletivos recorrentes e cruzamentos endogâmicos e não pela presença de alelos nulos.

O teste para o efeito de gargalo genético não indicou que as populações adultas e jovens tenham experimentado esse processo em nenhum dos modelos (IAM, TPM e SSM) (Tabela 8). Mesmo a população de IRA adulta, a única a apresentar locos em desequilíbrio de ligação após correção de Bonferroni (Tabela 4), não obteve indicativo de gargalo recente. O teste realizado pelo *Bottleneck* é mais sensível à detecção de gargalos que ocorreram ao longo das últimas 2 a 4 gerações de N_e (tamanho efetivo) e, para a maioria dos parâmetros, tem mais poder para detectar gargalos mais recentes (Lin et al. 2012). A fragmentação no estado do Paraná começou por volta de 1910 e se intensificou na década de 1950 (Medeiros et al. 2005). *C. xanthocarpa* sendo uma espécie secundária tardia, possui um ciclo de vida médio a longo, em torno de 60 a 80 anos, o que possibilitaria a detecção do efeito de gargalo genético pelo software. Desta forma, é provável que o processo de fragmentação no estado do Paraná ainda não tenha afetado de forma significativa o tamanho efetivo populacional. A identificação de populações submetidas a gargalos recentes é importante porque as mesmas podem não ter tido o tempo necessário de se adaptarem aos problemas frequentemente causados pelo tamanho populacional reduzido e, conseqüentemente, podem ter um alto risco de extinção (Lee et al. 2002). Quanto antes se detectar um gargalo, maior a probabilidade de que efeitos deletérios do mesmo possam ser evitados ou minimizados através de procedimentos

mitigadores de manejo, tais quais o enriquecimento de habitat ou introdução de imigrantes (Luikart et al. 1998).

O efeito de deriva em *C. xanthocarpa* foi bem menos intenso quando comparado com *Luehea divaricata* (Conson et al. 2013) e *Parapiptadenia rigida* (Miranda et al. 2014), provavelmente devido ao menor interesse econômico na madeira de *C. xanthocarpa* quando comparadas com essas espécies.

4.6.2 Estrutura Genética De Populações Em *Campomanesia xanthocarpa*

A análise da variância molecular (AMOVA) para os indivíduos adultos mostrou que a maior parte da variabilidade genética está distribuída dentro das populações adultas e jovens (Tabela 5). O valor de F_{ST} para os adultos indica uma alta diferenciação genética entre as populações (Tabela 5), como descrito por Hartl e Clark (2007). Este padrão de distribuição está de acordo com o esperado em espécies alógamas ou de sistema misto, e observado para outras espécies arbóreas predominantemente alógamas, com eficiente mecanismo de dispersão de sementes (Kageyama et al. 2003). Segundo Carvalho (2006), *C. xanthocarpa* têm suas flores muito apreciadas por abelhas (*Apis mellifera*), tornando-as polinizadoras da espécie. Além disso, *C. xanthocarpa* possui autoincompatibilidade, fato que favorece a manutenção de sua alta variabilidade dentro das populações (Santos 2015). O alto nível de diferenciação genética entre populações normalmente é decorrente de fluxo gênico limitado, devido a fragmentação de habitats e o declínio de polinizadores, o que pode ocasionar o isolamento reprodutivo das mesmas. Também, a presença de alelos exclusivos em algumas populações é indicativa de fluxo gênico restrito, o que pode levar a um aumento da divergência genética entre as mesmas (Seoane et al. 2000).

A análise bayesiana de agrupamento genético (Figura 6; Figura 7), indicou um melhor valor de delta K para K=2, porém, o segundo melhor delta K (K=3) parece representar melhor os dados, pois foi mais congruente com as análises de agrupamento da Neighbor-Net (Figura 8; Figura 9) e PCoA (Figura 10; Figura 11). Enquanto K=2, para os adultos, separa as populações mais ao norte da amostragem (EEC e SFR) do restante, o K=3 separa as populações em um grupo mais ao norte, um mais ao sul e um terceiro intermediário. Apesar dos agrupamentos nos adultos não poderem ser explicados pelos parâmetros de diversidade genética, é possível

observar na figura do mapa das populações amostradas (Figura 1) uma tendência à distribuição longitudinal dos agrupamentos genéticos. Portanto, é provável que algum fator ecológico seja responsável pela disposição das diferentes constituições genotípicas observadas nessas populações. Desta maneira, no *cluster* mais ao norte ($22^{\circ}36'23.20''S - 23^{\circ}08'18.56''S$), agruparam-se as populações EEC e SFR, no segundo *cluster*, com uma composição mais intermediária no sentido norte-sul ($23^{\circ}09'46,46'' - 24^{\circ}16'42,98''$) agruparam-se as populações MGO, ORT e VEN e no terceiro *cluster* mais ao sul ($25^{\circ}10'21,98'' - 25^{\circ}21'26,96''$) se encontram as populações PNI e IRA. Nesta análise de agrupamento foi possível observar que as populações de SFR, VEN e PNI encontram-se mais homogêneas em relação às demais, enquanto que, as populações de EEC, MGO, ORT e IRA apresentaram indivíduos migrantes de outras populações. A ocorrência de indivíduos migrantes nessas populações poderia ser explicada pela taxa de fluxo gênico entre as mesmas. Porém, de acordo com a análise realizada pelo software *BayesAss*, as taxas de migração nas últimas quatro gerações podem ser consideradas baixas (Tabela 7). Portanto, é possível que o compartilhamento genético entre essas populações seja devido a retenção de polimorfismo ancestral, uma vez que, em um passado recente, a Mata Atlântica no estado do Paraná era uma floresta contínua (Fonseca 1985; Ribeiro et al. 2009), à qual, provavelmente, essas populações se encontravam conectadas o que propiciava o fluxo gênico entre as mesmas.

A análise de agrupamento bayesiano entre jovens e adultos, assim como apenas entre os adultos, teve como melhor delta K um número de $K=2$ agrupamentos, mantendo jovens e adultos de PNI em um cluster distinto de ORT jovens e adultos e VEN jovens e adultos. Entretanto, quando consideramos o segundo melhor delta K ($K=3$) é possível observar três *clusters* distintos, um para cada população de adultos e seus respectivos jovens. Isso ressalta que as frequências alélicas entre jovens e adultos ainda não foram afetadas pelo processo de fragmentação do habitat nas regiões amostradas, e portanto, possuem a mesma constituição genotípica.

Apesar da alta estruturação observada na AMOVA e análises de agrupamento, o teste de Mantel não mostrou correlação significativa estatisticamente entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas ($r = 0,46$; $P = 0,05$; Figura 4), ainda que, populações com grandes distâncias geográficas (PNI e SFR) tenham apresentado alta diferenciação genética entre elas e populações mais

próximas geograficamente tenham apresentando menor distância genética (ORT e MGO). A falta de suporte estatístico (P -valor) para o teste de Mantel pode ser devido principalmente à população de IRA, a qual, mesmo apresentando grandes distâncias geográficas em relação às outras populações, apresentou valores moderados a baixos de diferenciação genética em relação a elas (Tabela 6). Essa dissonância entre distância geográfica e a distância genética para a população de IRA provavelmente direciona o teste de Mantel que, ainda que não tenha sido significativo estatisticamente, mostra em sua reta uma clara tendência ao isolamento reprodutivo populacional (Figura 4). Segundo Ward et al. (2005) a fragmentação de habitats aumenta o isolamento entre os fragmentos e reduz o fluxo gênico, aumentando a diferenciação genética entre os remanescentes perturbados. Todos os fragmentos amostrados estão cercados por fazendas agropastoris, o que, provavelmente contribui para o isolamento populacional, por restringir o acesso dos polinizadores às populações e por consequência, o fluxo gênico.

Segundo Young et al. (1996) as mudanças populacionais associadas com a degradação do habitat levam a diminuição da diversidade genética com uma alta divergência interpopulacional, devido a redução do fluxo gênico. Essas mudanças afetam a viabilidade das populações a curto e em longo prazo. A curto prazo pode ocorrer, nessas populações, o aumento a suscetibilidade a doenças e pragas e fixação de alelos deletérios (Isagi et al. 2007). A longo prazo, a perda da diversidade genética deve reduzir a capacidade das populações a responderem as mudanças das pressões seletivas (Futuyma 2018).

O entendimento da existência de estruturação genética das populações, auxilia no estabelecimento de medidas que auxiliam na conservação genética da espécie (Tarazi 2009). Algumas medidas poderiam ser tomadas para manter a variabilidade das populações e garantir um maior fluxo gênico entre as mesmas. Uma solução a curto prazo seria o transplante de mudas. A longo prazo, os corredores ecológicos seriam uma medida que permitiria a dispersão dos polinizadores entre fragmentos e, conseqüentemente, aumentaria o fluxo gênico entre espécies (Torezan et al. 2005).

4.7 CONCLUSÃO

A espécie *C. xanthocarpa* apresentou níveis moderados de diversidade genética, tanto para as populações adultas quanto para os jovens, não havendo

diferença significativa estatisticamente entre elas. Foi encontrada uma maior variação genética dentro de populações do que entre populações, condizente com a distribuição da variação genética encontrada em espécies alógamas. O processo de endogamia pode estar atuando na maioria das populações adultas e jovens, podendo comprometer futuramente a diversidade genética da espécie. A alta diferenciação genética entre as populações, a estruturação entre as mesmas e a baixa taxa de migrantes indica fluxo gênico restrito devido ao isolamento geográfico entre elas, resultado direto da fragmentação nas áreas de ocorrência de *C. xanthocarpa*. Por enquanto as populações encontram-se estáveis, porém, futuramente, elas tendem a experimentar um declínio na variabilidade genética, o que pode interferir no valor adaptativo das populações. Visto isso, estratégias de conservação e manejo devem ser adotadas para que a variabilidade genética das populações não seja comprometida.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A metodologia empregada para isolar os locos microssatélites em *C. xanthocarpa*, utilizando bibliotecas enriquecidas, se mostrou eficiente, permitindo desenvolver 10 pares de *primers* com boa aplicabilidade em estudos populacionais da espécie.

As análises populacionais para *C. xanthocarpa* evidenciou níveis moderados de diversidade genética, tanto para as populações adultas quanto para os jovens. Entretanto, o processo de endogamia pode estar atuando nas populações, podendo comprometer no futuro a diversidade genética da espécie. A alta diferenciação genética entre as populações indica fluxo gênico restrito, devido a fragmentação nas áreas de ocorrência de *C. xanthocarpa*. Atualmente as populações encontram-se estáveis, porém, futuramente, elas tendem a experimentar um declínio na variabilidade genética. Visto isso, estratégias de conservação e manejo devem ser adotadas para que a variabilidade genética das populações não seja comprometida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro. Ao auxiliar operacional Sr. Edson Mendes Francisco pela coleta de material e aos fiscais do Parque Nacional do Iguaçu pelo acompanhamento na coleta.

REFERÊNCIAS – ARTIGO A

- ALICE, C. B., SIQUEIRA, N. C. S., MENTZ, L. A., SILVA, G. A. A. B. & JOSÉ, K. F. D. (1995). *Plantas medicinais de uso popular*. Atlas Farmacognóstico, Canoas, RS.
- BARBARÁ, T., PALMA-SILVA, C. S. E., GI, G. M. P., BERED, F. N., FAY, M. EL F. & LEX, C. T. (2007). Cross-species transfer of microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, (16), 3759-3767. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03439.x
- BIAVATTI, M. W., FARIAS, C., CURTIS, F., BRASIL, L. M., HORT, S., SCHUSTER, L. & PRADO, S. R. (2004). Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2), 385-389. DOI: 10.1016/j.jep.2004.04.015
- BILLOTTE, N., LAGODA, P. J. L., RISTERUCCI, A. M. & BAURENS, F. C. (1999). Microsatellite-enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54(4), 277 – 288.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M. & DAVIS, R. W. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, (32), 314-331.
- CHAVES, C. L., RUAS, C. F., & RUAS, E. A. (2014). Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite loci for *Hypochoeris catharinensis* (Asteraceae) and cross-amplification in related species. *Journal of Genetics*, 94(2), 39-42. DOI: 10.1007/s12041-015-0539-4.
- CHAVES, C. L., SEBEN, A. M., BARANOSKI, A., GOEZ, B. D., GAINO, A. P. S. C., RUAS, C. F., RUAS, E. A. & RUAS, P. M. (2016). Gene dispersal via seeds and pollen and their effects on genetic structure in the facultative-apomitic neotropical tree *Aspidosperma polyneuron*. *Silvae Genetica*, 65(2), 46-57.
- CONSON, A. R. O., RUAS, E. A., VIEIRA, B. G., RODRIGUES, L. A., COSTA, B. F., BIANCHINI, E., PRIOLI, A. J., RUAS, C. F. & RUAS, P. M. (2013). Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). *Genetica*, 141(5-6), 205-215.

CRAVO, A. B. (1994). Frutas e ervas que curam: panacéia vegetal. Hemus, São Paulo.

DENG, S., WANG, X., ZHU, P., WEN, Q. & YANG, C. (2015). Development of polymorphic microsatellite markers in the medicinal plant *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, (58), 149-155. DOI: 10.1016/j.bse.2014.11.009

DOYLE, J. J., & DOYLE, J. L. (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, (19), 11–15.

EDWARDS K. J., BARKER J. H., DALY A., JONES, C. & KARP, A. (1996). Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques*, (20), 758-760.

ELLEGREN, H. (2004). Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, (5), 435-445.

EXCOFFIER, L., & LISCHER, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567. DOI:/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

LEWONTIN, R. C. (1964). The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics*, (49), 49-67.

LORENZI, H. (2002). Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo.

MARSHALL, T.C., SLATE, J., KRUUK, L., PEMBERTON, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7(5), 639–655. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x

RAMOS, R. F., MONTEIRO, M., ZUCCHI, M. I., PINHEIRO, J. B., MARTINEZ, C. A., MESTRINER, M. A. & MARIN, A. L. A. (2011). Microsatellite markers for *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae), an endangered tropical tree species. *American Journal of Botany*, e300-e302.

ROZEN, S., & SKALETSKY, H. J. (2000). Primer3: *Bioinformatics Methods and Protocols*. In S. Krawetz & S. Misener (Eds) *Methods in Molecular Biology* (p. 365-386). New York: Humana Press.

RUAS, E. A., CONSON, A. R. O., COSTA, B. F., DAMASCENO, J. O., RODRIGUES, L. A., RECK, M., VIEIRA, A. O. S., RUAS, P. M., RUAS, C. F. (2009). Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) and intergeneric transferability. *Conservation Genetics Resources*, (1), 245-248. DOI: 10.1007/s12686-009-9060-5.

VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P., SHIPLEY, P. (2004). MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in

microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

WARE, D., JAISWAL, P., NI, J., PAN, X. (2002). Gramene: a resource for comparative grass genomics. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 103-105. DOI: 10.1093/nar/30.1.103

REFERÊNCIAS – ARTIGO B

- Aguiar, R. V., Cansian, R. L., Kubiak, G. B., Slaviero, L.B., Tomazoni, T. A., Budke, J.C., Mossi, A. J. 2013. Variabilidade genética de *Eugenia uniflora* L. em remanescentes florestais em diferentes estádios sucessionais. Rev. Ceres. **60**(2): 226-233. Doi: 10.1590/S0034-737X2013000200011.
- Ahmad, A., Wang, J.D., Pan, Y.B., Sharif, R., Gao, S.J. 2018. Development and Use of Simple Sequence Repeats (SSRs) Markers for Sugarcane Breeding and Genetic Studies. Agron. **8**(260). Doi:10.3390/agronomy8110260.
- Allendorf, F. W., Luikart, G. 2007. Conservation and the genetics of Population. Blackwell, UK. 642 p.
- Allendorf, F. W., Funk, C.W., McKay, J.K., and Hohenlohe, P.A. 2012. Harnessing genomics for delineating conservation units. Trends Ecol Evol. **27**(9): 489-496. Doi: 10.1016/j.tree.2012.05.012.
- Alice, C.B. 1995. Plantas medicinais de uso popular: atlas Farmacognóstico. Canoas, Rio Grande do Sul.
- Azevedo, V.C.R., Kanashiro, M., Ciampi, A.Y., and Grattapaglia, D. 2007. Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev. a heavily logged Amazonian timber species. J Hered. **98**: 646-654. Doi: 10.1093/jhered/esm074.
- Balloux, F., and Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Mol Ecol **11**: 155-165. Doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01436.x
- Barrett, S. 1988. The evolution, maintenance, and loss of self-incompatibility systems. In: Lovett-Doust J, Lovett-Doust L (eds) Plant reproductive ecology. Oxford University Press, New York, pp 98–124.
- Barroso, G. M. 1991. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: Universitária. **2**. 377 p.
- Berg, E.E., and Hamrick, J.L. 1997. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. Can J For Res. **27**: 415-424. Doi: 10.1139/x96-195.
- Besnier, F., and Glover, K.A. 2013. ParallelStructure: A R Package to Distribute Parallel Runs of the Population Genetics Program STRUCTURE on Multi-Core Computers. Plos one **8**: 70651. Doi: 10.1371/journal.pone.0070651.
- Biavatti, M.W.C., Farias, C., Curtis, F., and Brasil, L.M. 2004. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr aqueous extract: weight control and biochemical parameters. J Ethnopharmacol. **93**(2-3): 385-389. Doi: 10.1016/j.jep.2004.04.015.
- Bittencourt Jr, N. S. Tese. Auto-incompatibilidade de ação tardia e outros sistemas reprodutivos em Bignoniaceae. Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia. 2003.

- Bradburd, G.S., Ralph, P.L., Coop, G.M. 2013. Disentangling the effects of geographic and ecological isolation on genetic differentiation. *Evol.* **67**(11): 3258. Doi: 10.1111/evo.12193.
- Bradshaw, C.J.A., Sodhi, N.S., Brook, B.W. 2009. Tropical turmoil: a biodiversity tragedy in progress. *Front Ecol Environ.* **7**(2): 79-87. Doi: 10.1890/070193.
- Bryant, D., and Moulton, V. 2004. Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol.* **21**(2): 255-65. Doi: 10.1093/molbev/msh018.
- Byrne, M., Marquez-Garcia, M. I., Uren, T., Smith, D. S. and Moran, G. F. 2000. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *J. Bot.* **44**:331–341.
- Caixeta, E. T., Ferrão, L.F.V., and Zambolim, E. M. 2013. Marcadores Moleculares. *Biologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas*. Aluizio Borém e Roberto Fritsche-Neto eds. Visconde do Rio Branco: Suprema, p.31-68.
- Carvalho, P.E.R. 2006. Espécies arbóreas brasileiras. Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras, 2nd ed. Brasília, DF: Embrapa informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas. 627 p.
- Carvalho, A.C.M., Freitas, M.L.M., Moraes, S.M.B., Moraes, M.L.T., Strangheti, V., Alzate-Marin, A.L., and Sebben, A.M. 2010. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*. *Rev Bras Bot.* **33**(4): 599-606. Doi: 10.1590/S0100-84042010000400008.
- Cascante, A., Quesada, M., Lobo, J.J., and Fuchs, E.A. 2002. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conserv Biol.* **16** (1): 137-147. Doi: 10.1046/j.1523-1739.2002.00317.x.
- Conson, A.R.O., Ruas, E.A., Vieira, B.G., Rodrigues, L.A., Costa, B.F., Bianchini, E., Prioli, A.J., Ruas, C.F., Ruas, P.M. 2013. Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). *Genetica.* **141**(4): 205–215. Doi: 10.1007/s10709-013-9719-4.
- Corrêa, M. P. 1974. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 5 eds. 512 p.
- Chapuis, M. P., and Estoup, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* **24**:621–631. Doi: 10.1093/molbev/msl191.
- Chaves, C. L., Sebbenn, A. M., Baranoski, A., Goes, B.D., Gaino, A.P.S.C., Ruas, C.F, Ruas, E.A., and Ruas, P.M. 2017. Gene dispersal via seeds and pollen and their effects on genetic structure in the facultative-apomictic neotropical tree *Aspidosperma polyneuron*. *Silvae Genetica.* **65**(2): 46-57. Doi: 10.1515/sg-2016-0016.

- Cravo, A.B. 1994. Frutas e ervas que curam: panacéia vegetal. São Paulo, Hemus.
- Cole, T.C. 2003. Genetic variation in rare and common plants. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* **34**: 213-237. Doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.030102.151717.
- Colevatti, R.G., Grattapaglia, D., and Hay, J.D. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Mol Ecol.* **10** (2): 349-356. Doi: 10.1046/j.1365-294X.2001.01226.x.
- Dakin, E.E., and Avise, J.C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity.* **93**: 504 – 509.
- Dewoody, J., Nason, J.D., Hipkins, V.D. 2006. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Mol Ecol Notes.* **6** (4): 951-957. Doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01449.x
- Dias, M.C., Vieira, A.O.S., Nakajima, J.N., Pimenta, J.A., and Lobo, P.C. 1998. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares do rio Iapó, na bacia do rio Tibagi, Tibagi, PR. *Rev Bras Bot.* **21**(2). Doi: 10.1590/S0100-84041998000200011.
- Doyle, J.J.T., and Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* **12**:13-15. Doi: 10.4236/fns.2015.610086.
- Earl, D. A., and VonHoldt, B.M. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour.* **4**: 359-361. Doi:10.1007/s12686-011-9548-7.
- Ellstrand, N.C., and Elam, D.R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* **24**:217-242. Doi: 10.1146/annurev.es.24.110193.001245.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**(2): 479–491.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform*, **1**: 47–50. Doi:10.1177/117693430500100003.
- Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* **43**: 487-515. Doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419.
- Ferrão, L.F.V., Caixeta, E. T., Souza, F. de F., Zambolim, E. M., Cruz, C. D., Zabolim, L., and Sakiyama, N. S. 2013. Comparative study of different molecular markers for classifying and establishing genetic relationships in *Coffea canephora*. *Plant Syst. Evol.* **229**: 225-238.
- Ferreira, D. G. Dissertação. Análise genética da espécie Neotropical *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes: Cichlidae). Universidade Estadual de Londrina. Fevereiro de 2013.

Ferreira, M.E., and Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p.

Finger, A., Kettle, C.J., Kaiser-Bunbury, C.N., Valentin, T., Mougat, J., and Ghazoul, J. 2012. Forest fragmentation genetics in a formerly widespread island endemic tree: *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae). *Mol Ecol.* **21**(10): 2369-2382. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05543.x.

Futuyma, D.J. 2018. Evolution. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 603 p.

Frankham, R., Ballou, J.D., and Briscoe, D.A. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. 1st ed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, BR. 280 p.

Fonseca, G.A.B. 1985. The vanishing Brazilian Atlantic Forest. *Biol Cons.* **34**(1): 1-18. Doi: 10.1016/0006-3207(85)90055-2.

Gandara, F.B., and Kageyama, P.Y. 1998. Indicadores de sustentabilidade de florestas naturais. Série Técnica IPEF. **12**(31): 79-84.

Giusti, J., Kettener, K., and Fuchs-Ferraz, M. C. P. 2016. Influência do sequenciamento de nova geração no futuro da genética da conservação. *Rev Rec Gen.* **2**: 35-47.

Godoy, S.M., Silva, J.F.M., Paula, G.B.N., Ruas, P.M., Góes, B.D., and Ruas, C.F. 2017. Phylogenetic relationships of Brazilian *Mikania* species (Asteraceae, Eupatorieae) based on multilocus DNA markers. *Bot J Linean Soc.* **184**: 326–346. Doi: 10.1093/botlinnean/box030.

Góes, B.D. Dissertação (Mestrado). Estrutura genética de populações de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) ao longo da bacia do Rio Laranjinha. Universidade Estadual do Norte do Paraná – Campus Luiz Meneghel. Agosto de 2014.

Góes, B. D., Ruas, E. A., Benício, L. M., Cassiano, D., Souza, F. P., and Ruas, P. M. 2019. Development and characterization of microsatellite loci for *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae) and cross amplification in related species. *Acta Sci Biol Sci.* **41**. Doi: 10.4025/actascibiolsoci.

Goudet, J., and Jombart, T. 2015. hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics. R package version 0.04–22. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/hierfstat/index.html>. [accessed 14 dec 2018].

Gonzales, E., and Hamrick, J.L. 2005. Distribution of genetic diversity among disjunct populations of the rare forest understorey herb, *Trillium reliquum*. *Heredity.* **95**(4):306-14. Doi: 10.1038/sj.hdy.6800719.

Ghazoul, J. 2005. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biol Rev.* **80**: 413-443. Doi: 10.1017/S1464793105006731.

Guidugli, M.C. Tese (Doutorado). Estudos Genéticos da Espécie Florestal *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze: Diversidade, Sistema de Cruzamento e Fluxo Gênico Contemporâneo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2016.

Hakeem, K.R., Ahmad, P., and Ozturk, M. 2013. Crop Improvement: New approaches and modern techniques. Springer Science & Business Media, 493 p.

Hansen, Z.R., Everts, K.L., Fry, W.E., Gevens, A.J., Grünwald, N.J., Gugino, B.K., Johnson, D.A., Johnson, S.B., Judelson, H.S., Knaus, B.J., McGrath, M.T., Myers, K.L., Ristaino, J.B., Roberts, P.D., Secor, G.A. & Smar, C.D. 2016. Genetic variation within clonal lineages of *Phytophthora infestans* revealed through genotyping-by-sequencing and implications for late blight epidemiology. Plos one, **11**(11). Doi: 10.1371/journal.pone.0165690

Hanski, I., Zurita, G. A., Bellocq, M. I., Rybicki, J. 2013. Species-fragmented area relationship. PNAS, **110**(31): 12715-12720. Doi: 10.1073/pnas.1311491110.

Hanson, T.R., Brunsfeld, S.J., Finegan, B., and Waits, L.P. 2008. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. Mol Ecol. **17**(8):2060-2073. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03726.x.

Hartl, D.L., and Clark, A.G. 2007. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Inc. 4. Ed. 565 p.

Horn, H. S. 1974. The ecology of secondary succession. Ann Rev Ecol Syst. **5**: 25-37. Doi: 10.1146/annurev.es.05.110174.000325.

Huson, D.H., Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Mol Biol Evol. **23**(2): 254-67. Doi: 10.1093/molbev/msj030.

Isagi, Y., Saito, D., Kawaguchi, H., Tateno, R., and Watanabe, S. 2007. Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of *Aesculus turbinata* populations. J Ecol. **95**(5): 983-990. Doi: 10.1111/j.1365-2745.2007.01272.x.

Jennings, S.B., Brown, N.D., Boshier, D.H., Whitmore, T.C., and Lopes, J.C.A. 2001. Ecology provides a pragmatic solution to the maintenance of genetic diversity in sustainably managed tropical rain forests. For Ecol Manage. **154**: 1–10. Doi: 10.1016/S0378-1127(00)00637-X.

Kageyama, P.Y., Sebbenn, A.M., Ribas, L.A., Gandara, F.B., Castellen, M., Percim, M.B., Vencovsky, R. 2003. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. Sci For. **64**: 93-107.

Kalinowsky, S. 2005. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. Mol Ecol Notes **5**:187–189. Doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00845.x.

Kamvar, Z.N., Tabima, J.F., and Grünwald, N.J. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* **2**:e281. Doi: 10.7717/peerj.281.

Kamvar, Z.N., Brooks, J.C., and Grünwald, N.J. 2015. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Front. Genet.* **6**:208. Doi: 10.3389/fgene.2015.00208.

Lee, S.L., Kevin, K.S., Saw, N.G., Adnan-Norwati, M. H., Salwana, S., Lee, C.T., and Norwati, M. 2002. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virgin Jungle reserves in Peninsular Malaysia. *Am J Bot.* **89**(3): 477-459.

Legendre, P., and Legendre, L. 2012. *Numerical Ecology*. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, NL. 1006 p.

Lin, L., Qu, Y., Hong Li, H., Zhou, K.Y., and Ji, X. 2012. Genetic structure and demographic history should inform conservation: Chinese cobras currently treated as homogenous show population divergence. *PloS One.* **7**(4). Doi:10.1371/journal.pone.0036334.

Lorenzi, H. 2002. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas nativas do Brasil*. 2 ed. Nova Odessa: Plantarum, SP, BR. 384 p.

Lowe, A.J., Boshier, D., Ward, M., Bacles, C.F.E., and Navarro, C. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity.* **95**: 255 – 273.

Luikart, G., Allendorf, F.W., Cornuet, J.M., Sherwin, W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered.* **89**(3): 238–247. Doi: 10.1093/jhered/89.3.238.

Maudet, C., Luikart, G., and Taberlet, P. 2002. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *J Anim Sci.* **80**: 942-950.

Markman, B. E. O. Dissertação (Mestrado). Caracterização farmagnóstica de *Campomanesia xanthocarpa* Myrtaceae. Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo. 2002.

Maksylewicz, A., and Baranski, R. 2013. Intra-population genetic diversity of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) assessed by analysis of microsatellite markers. *Acta Biochim Pol.* **60**(4): 753-60. Doi:

Martins, K., dos Santos, J.D., Gaiotto, F.M., Moreno, M.A., and Kageyama, P.Y. 2008. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. *Revista Brasil. Bot.* **31**(1): 61-69. Doi: 10.1590/S0100-84042008000100007.

Massucato, L. R. Dissertação (Mestrado). Variabilidade genética em *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg. (Peroba-rosa) em populações do estado do Paraná. Universidade Estadual de Londrina. Fevereiro de 2018.

Medeiros, J.D., Savi, M., Brito, B.F.A. 2005. Seleção de áreas para criação de Unidades de Conservação na Floresta Ombrófila Mista. *Biotemas*. **2**(18): 33-50. Doi: 10.5007/%25x.

Melo, A.T.O., Coelho, A.S.G., Pereira, M.F., Blanco, A.J.V., and Franceschinelli, E.V. 2015. Genética da conservação de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica na APA Fernão Dias. *Rev Árvore*. **39**(2): 365-374. Doi: 10.1590/0100-67622015000200016.

Menges, E.S. 1991. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. *Conserv Biol*. **5**(4): 158-164. Doi: 10.1111/j.1523-1739.1991.tb00120.x

Miller, M.A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. pp 1–8. New Orleans, LA.

Miranda, B.F.D.A. 2014. Diversidade genética em populações de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fabaceae – Mimosoideae) por marcadores microsatélites. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina.

Monquero, P.A., and Oliveira, A.S. 2018. Os herbicidas causam impactos na sobrevivência e desenvolvimento de abelhas? *Rev Bras Herb*. **17**(1). Doi: 10.7824/rbh.v17i1.533.

Montagna, T., Ferreira, D.K., Steiner, F., Fernandes, C.D., Bittencourt, R., Silva, J.Z., Mantovani, A., and Reis, M.S. 2012. A importância das Unidades de Conservação na manutenção da diversidade genética de Xaxim (*Dicksonia sellowiana*) no Estado de Santa Catarina. *Revista Científica de Biodiversidade Brasileira*. **2**.

Moraes, P.L.R., and Derbyshire, M.T.V.C. 2003. Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). *Biota Neotrop*. **3**(1). Doi: 10.1590/S1676-06032003000100008.

Moraes-Filho, R.M. Tese (Doutorado). Efeitos genéticos da fragmentação florestal sobre a espécie de sub-bosque *Metrodorea nigra* em áreas remanescentes de floresta estacional semidecidual em Ribeirão Preto-SP. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo. 2014.

Moreira, R. O. Dissertação (Mestrado). Desenvolvimento de marcadores microsatélites e análise da diversidade e estrutura genética de populações de cambuci (*Campomanesia phaea*). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2017.

Morelato, L.P.C., Haddad, C.F.B. 2000. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*. **32**(4): 786-792. Doi: 10.1646/0006-3606(2000)032[0786:ITBAF]2.0.CO;2.

- Mori, N. T.; Moraes, M. L. T.; Morita, C. M.; Mori, E. S. 2012. Genetic diversity between and within populations of *Handroanthus heptaphyllus* Vell. Mattos using microsatellite markers. *Cerne*. **18**(1): 9-15. Doi: 10.1590/S0104-77602012000100002.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., and Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. **403**(6772): 853–858. Doi: 10.1038/35002501.
- Nei, M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *PNAS*. **70** (12): 3321-3323. Doi: 10.1073/pnas.70.12.3321.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. **89**(3): 583-590.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. 512 p.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R. 2016. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.3-4. [accessed 14 dec 2018].
- Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Vieira, M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol*. **29**(2): 294-307. Doi: 10.1590/S1415-47572006000200018.
- Onipchenko, V. G., and Pavlov, N. 2009. Local Plant Species Richness Depends on the Total Area of Alpine Communities. *Dokl Biol Sci*. **427**(1): 381-383. Doi: 0.1134/S001249660904022X.
- Paradis, E. 2010. *pegas: an R package for population genetics with an integrated modular approach*. *Bioinforma Oxf Engl*. **26**(3): 419–20. Doi: 10.1093/bioinformatics/btp696.
- Perez, C. M. Dissertação (Mestrado). *Medidas de Diferenciação Genética em Populações Simuladas sob Endogamia e Seleção Divergente*. Universidade Federal de Viçosa. Dezembro de 2008.
- Pearse, D., and Crandall, K.A. 2004. Beyond FST: Analysis of population genetic data for conservation. *Conserv Genet*. **5**: 585-602. Doi: 10.1007/s10592-003-1863-4.
- Pimenta, J.A. Tese (Doutorado). *Estudo populacional de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae) no Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, PR*. Universidade Estadual de Campinas. 1998.
- Piry, S., Luikart, G., and Cornuet, J.M. 1999. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered*. **90**(4): 502-503. Doi: 10.1093/jhered/90.4.502.
- Powell, W., Machray, G.C., Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci*. **1**(7): 215–222. Doi:10.1016/1360-1385(96)86898-1. Available from [https://www.cell.com/trends/plant-science/fulltext/1360-1385\(96\)86898-1](https://www.cell.com/trends/plant-science/fulltext/1360-1385(96)86898-1) [Accessed 25 January 2019].

- Puttker, T., Bueno, A.A., Barros, C.S., Sommer, S., Pardini, R. 2011. Immigration rates in fragmented landscapes- Empirical evidence for the importance of habitat amount for species persistence. *PLoS One*. **6**(11): e27963. Doi: 10.1371/journal.pone.0027963
- Prevosti, A., Ocana, J., and Alonso, G. 1975. Distances between populations of *Drosophila subobscura*, based on chromosome rearrangement frequencies. *Theor Appl Genet*. **45**(6):231–241. Doi: 10.1007/BF00831894.
- Primack, R. B., and Rodrigues, E. 2001. *Biologia da Conservação*. Londrina, Pr. 328 p.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*. **155**(2): 945-59.
- R CoreTeam. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>. [accessed 14 dec 2018].
- Ranta, P., Blom, T., Niemela, J., Joensuu, E., and Siitonen, M. 1998. The fragmented Atlantic Rainforest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. *Biodivers Conserv*. **7**: 385-403.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., Drummond, A.J. 2014. Tracer: a program for analyzing results from Bayesian MCMC programs, Version 1.6. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. [Accessed 14 dec 2018].
- Raposo, A., Martins, K., Ciampi, A.Y., Wadt, L.H.O., and Veasey, E.A. 2007. Genetic diversity structure of crabwood in Baixo Acre, Brazil. *Pesq Agropec Bras*. **42** (9): 1291-1298. Doi: 10.1590/S0100-204X2007000900011.
- Reed, D.H. 2005. Relationship between population size and fitness. *Conserv Biol*. **19** (2): 563-568. Doi: 10.1111/j.1523-1739.2005.00444.x.
- Reitz, P.R. 1977. *Flora Ilustrada Catarinense – Myrtaceas*. Parte 1. Raolino Reitz. 1ed. Itajaí, SC, BR.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. **43** (1) :223–225. Doi: 10.2307/2409177.
- Rodrigues, L.A. Tese (Doutorado). Estrutura genética de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq) Engl. (Sapotaceae) por marcadores microssatélites. Universidade Estadual de Londrina. 2014.
- Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour*. **8**(1): 103–106. Doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martesen, A.C., Ponzoni, F.J., and Hirota, M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest

distributed? Implications for conservation. *Biol Cons.* **142**(6): 1141-1153. Doi: 10.1016/j.biocon.2009.02.021.

Sant'anna, L.S. Dissertação (Mestrado). Efeitos do extrato da *Campomanesia xanthocarpa* sobre parâmetros cardiovasculares em ratos tratados com frutose. Universidade Federal do Pampa. Setembro de 2012.

Santoro, A. Tese (Doutorado). Identificação de Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) no gene nove-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED) em *Eucalyptus*. Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho" - Instituto De Biociências Campus de Botucatu. Março de 2010.

Santos, C. M. R. Tese (Doutorado). Desenvolvimento estrutural associado à biologia reprodutiva de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae). Universidade Federal de Santa Catarina. Setembro de 2015.

Sebbenn, A. M., Kageyama, P. Y., Siqueira, A. C. M. F., and Zanatto, A. C. S. 2000. Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. *Scientia Forestalis*. **58**: 25-40.

Sebbenn, A.M., and Etori, L.C. 2001. Conservação genética ex situ de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênes misto. *Rev Instit Flores*. **13**(2): 201-211.

Serrote, C.M.L., Reiniger, L.R.S., Stefenon, V.M., Curti, A.R., Costa L.S and Paim, A.F. 2016. Simulating the selfing and migration of *Luehea divaricata* populations in the Pampa biome to investigate the conservation potential of their genetic resources. *Genet Mol Res*. **15**(3). Doi: 10.4238/gmr.15038410.

Seoane, C.E.S., Kageyama, P.Y., Sebben, A.M. 2000. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). *Sci For*. **57**:123-139.

Silva, D.C.G., Carvalho, M.C.C.G., Medri, C., Medri, M.E., Ruas, C.F., Ruas, E.A., and Ruas, P.M. 2012. Genetic Structure and Diversity of Brazilian Tree Species from Forest Fragments and Riparian Woods. In: *Genetic Diversity in Plants*. (Ed. M. Caliskan), pp. 392-412. Doi: 10.5772/2640.

Serviço Florestal Brasileiro (SBF). Sistema Nacional de Informação Florestal (SNIF). Available from: <http://snif.florestal.gov.br/en/dados-complementares/237-mata-atlanticatabelas-e-graficos>. [Accessed 25 January 2019].

Souza, D.C.L. 2015. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. *Rev Bras Plant Med*. **17**(3): 495-503. Doi: 10.1590/1983-084X/13_071.

Solé-Cava, A.J., and Cunha, H.A. A genética e a conservação da natureza. In: *Biologia Molecular e Evolução* (Eds Matioli, S.R. and Fernandes, F.M.C.), Holos, Ribeirão Preto. pp. 217-238.

- Shimizu, J.Y., Jaeger, P., and Sopchaki, S.A. 2000. Genetic variability in a remnant population of araucaria in the Iguacu National Park, Brazil. *Bol Pesq Florestais*. **41**:18-36.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol*. **18**(2): 233-234. Doi: 10.1038/72708.
- Tarazi, R. Tese (Doutorado). Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no cerrado. Universidade de São Paulo. 2009.
- Torezan, J. M. D., Souza, R. F. D., Ruas, P. M., Ruas, C. F., Camargo, E. H., and Vanzela, A. L. L. 2005. Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). *Braz Arch Biol Technol*. **48**(2): 171-180. Doi: 10.1590/S1516-89132005000200002.
- Vallilo, M.I., Moreno, P.R.H., Oliveira, E., Lamardo, L.C.A., and Garbelotti, M.L. 2008. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. *Ciênc Tecnol Aliment*. **28**: 231-237. Doi: 10.1590/S0101-20612008000500035.
- Vieira, M.L.C., Santini, L., Diniz, A. L., and Munhoz, C.F. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol*. **39**(3): 312-328. Doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.
- Viegas, M.P., Silva, C.L.S.P., Moreira, J.P., Cardin, L.T., Azevedo, V.C.R., Ciampi, A. Y., Freitas, M.L.M., Moraes, M.L.T., and Sebbenn, A.M. 2011. Genetic diversity and effective size in two *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., population under ex situ conservation. *Rev Árvore*. **35** (4): 769-779. Doi: 10.1590/S0100-67622011000500002.
- Ward, M., Dick, C.W., Gribel, R., Lemes, M., Caron, H., and Lowe, A.J. 2005. To self, or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity*. **95**: 246–254.
- Weir, B.S., and Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*. **38**(6): 1358–1370. Doi: 10.2307/2408641.
- Weir, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Wilson, G.A., and Rannala, B. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*. **163**(3):1177–1191.
- Wright, S.W. 1965. The interpretation of population structure by f-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. **19** (3):395-420. Doi: 10.2307/2406450.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., and Boyle, T. 1999. *POPGENE: Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis*. Release 1.31. University of Alberta, Edmonton (Alberta).

Young, A., Boyle, T., and Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol.* **11**(10):413-418. Doi: 10.1016/0169-5347(96)10045-8.

Young, A., Boyle, T. 2000. Forest Fragmentation. In *Forest conservation genetics: principles and practice*. Young, A., Boshier, D., and Boyle, T. (eds). CSIRO Publishing, Collingwood, p. 123-132.

Zane, L., Bargelloni, L., and Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol.* **11**: 1–16. Doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x

Zucchi, M.I., Brondanill, R.P.V., Pinheiro, J.B., Chaves, L.J., Coelho, A.S.G., Vencovsky, R. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genet Mol Biol.* **26**(4). Doi: 10.1590/S1415-47572003000400008.