



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUANA ALVES RODRIGUES

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE
CHRYSOPHYLLUM GONOCARPUM (MART. & EICHLER *EX*
MIQ.) ENGL. (SAPOTACEAE) POR MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Londrina
2014

LUANA ALVES RODRIGUES

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE
CHRYSOPHYLLUM GONOCARPUM (MART. & EICHLER *EX*
MIQ.) ENGL. (SAPOTACEAE) POR MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R696e Rodrigues, Luana Alves.
Estrutura genética em populações de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) por marcadores microssatélites / Luana Alves Rodrigues. – Londrina, 2014.
69 f. : il.

Orientador: Paulo Mauricio Ruas.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Sapotacea – Teses. 2. Mata Atlântica – Teses. 3. Genética de populações – Teses. 4. Endogamia – Teses. 5. Marcadores biológicos – Teses. I. Ruas, Paulo Mauricio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 634.0.2:575

LUANA ALVES RODRIGUES

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *CHRYSOPHYLLUM
GONOCARPUM* (MART. & EICHLER *EX* MIQ.) ENGL.
(SAPOTACEAE) POR MARCADORES MICROSSATÉLITES**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador. Prof. Dr. Paulo Maurício 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. Ricardo Tadeu de Faria
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de Março de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus irmãos de sangue e coração, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agadeço a Deus.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia pela oportunidade de realização do Doutorado, e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos no país e também pela possibilidade de aperfeiçoar meus conhecimentos fora do país como bolsista PDSE - Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas e a Prof^a. Dr^a. Claudete de Fátima Ruas por todo conhecimento compartilhado, amizade e compreensão nos momentos difíceis.

Aos professores Dr. Edmilson Bianchini, Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves, Dr. Ricardo Tadeu de Faria e ao Pós doutorando Eduardo Augusto Ruas do Programa Genética e Biologia Molecular por aceitarem o convite e participarem da banca examinadora.

A todos os professores que contribuíram com minha formação.

A minha co-orientadora de estágio do PDSE professora Dr^a. María Ángeles Ortiz da Universidad de Sevilla, pelos ensinamentos e amizade.

Aos pesquisadores que tive o privilégio de ter contato, em especial o Dr. Salvador Talavera, o que possibilitou um aumento do meu conhecimento durante o estágio em Sevilla.

Ao Eduardo, pelo auxílio, em especial na análise estatística e discussões dos artigos, essenciais para realização do trabalho.

Aos funcionários da Universidade Estadual de Londrina, Weda, Dario, Melissa, Edna, e em especial ao Ed pela grande contribuição durante as coletas.

Aos amigos da atual formação do Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas, Sara, Marcos, Kátia, Gabriela, Camila Ronchi, Camila Chaves, Jéssica, Nataiane, Ana e Bruna, que me ajudaram e ensinaram muito.

A todos meus grandes amigos que passaram pelo Laboratório, que contribuíram de uma forma indireta neste trabalho, André, Bruno, Diana e Bruna Vieira pelos anos de convivência, conversas, discussões e por me mostrarem o valor

da amizade, e que por razões especiais, estão dentro do meu coração, e jamais serão esquecidos.

Agradeço a toda minha família, em especial aos meus pais, Wanderley e Rosmarina e meus irmãos Hyanna, Dayana e Mateus, por estarem sempre ao meu lado, pelos valores ensinados, e acima de tudo pelo amor e carinho.

Por fim, agradeço a todos da Embrapa Arroz e Feijão pelo incentivo e compreensão na fase final de conclusão do trabalho.

Muito obrigada a todos!

RODRIGUES, Luana Alves. **Estrutura genética em populações de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) por marcadores microssatélites.** 2014. 69 f. Tese (Agronomia, área Fitotecnia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A Mata Atlântica é considerada um dos mais importantes *hotspots* do mundo devido a seu elevado nível de endemismo. Esta floresta tem sofrido um intenso processo de fragmentação do qual atualmente só lhe restam cerca de 8,5% em remanescentes florestais acima de 100 ha. *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae), é comumente encontrada neste bioma em áreas de solos mais úmidos e é frequentemente utilizada em programas de recuperação de áreas degradadas. Devido a sua importância foi utilizado oito pares de locos microssatélites para estudar a estrutura genética de nove populações amostradas ao longo de sua área de distribuição e também comparou-se indivíduos jovens e adultos em populações de dois fragmentos. Quanto a comparação entre indivíduos adultos das nove populações foi observado um total de 129 alelos, com valores de heterozigosidade média observada de 0,26 e heterozigosidade média esperada de 0,70, revelando um déficit de heterozigotos para todas populações. A maior parte da diversidade genética foi encontrada distribuída dentro das populações e dentro de indivíduos, e foram observados níveis moderados de diferenciação genética entre populações. Diferentes níveis de fluxo gênico entre as populações foram detectados. Não foi observada correlação entre dados de F_{ST} par a par e distância geográfica. Valores positivos e significativos de coeficiente endogamia foram encontrados para todas populações, provavelmente resultante da intensa fragmentação de habitat. A presença de diversos pares de locos em desequilíbrio de ligação confirma que estas populações sofreram perda de diversidade por deriva genética e depressão endogâmica. Foi verificado um recente gargalo genético em oito populações das nove estudadas. O dendrograma construído a partir da distância genética e a análise Bayesiana mostraram a formação de dois grupos principais, sendo um grupo com duas populações e o outro grupo composto pelas demais populações. Não foi verificado diferenças estatísticas entre os índices de diversidade genética entre adultos e jovens nos dois fragmentos estudados. Entretanto observou-se níveis elevados de endogamia, deriva genética tanto nas populações adultas quanto nas jovens sendo que o número de locos em desequilíbrio de ligação aumentou de uma geração para outra. Isto mostra que ocorreu mudanças na estrutura genética de uma geração para a geração seguinte. Dessa forma, os resultados mostraram que são necessários programas de conservação e manejo das populações de *C. gonocarpum*.

Palavras-chave: Endogamia. Fragmentação de habitats. Genética de populações. SSR. Variabilidade genética.

RODRIGUES, Luana Alves. **Genetic Structure of populations in *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) by microsatellites molecular markers**. 2014. 69 p. Tese (Agronomia, área Fitotecnia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The Brazilian Atlantic Rain forest is one of the most important hotspots in the world due its high endemism level. This forest has experienced an intense process of fragmentation and nowadays we found approximately around 8.5% in forest remnants above 100 ha. *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) is generally found in this biome in areas of wet soils, this tree is frequently used in recovery programs of degraded areas. Due to its importance we used eight pairs of microsatellite loci to study the genetic structure of nine population of this species sampled along its distribution area and also compared young and adult individuals in populations of two fragments. Comparing only adult individuals from nine populations was observed a total of 129 alleles and a mean observed heterozygosity of 0.26 and a mean expected heterozygosity of 0.70, revealing a heterozygosity deficit in all the populations studied. Most part of genetic diversity was observed within populations and individuals and only moderate levels of genetic differentiation among the populations were observed. Different levels of gene flow between the populations were detected. No correlation between pairwise F_{ST} and geographic distances was observed. Positive and significant values of inbreeding coefficient were found for all the populations probably resulting from intense habitat fragmentation. The presence of several pairs of loci in linkage disequilibrium confirms that these populations suffered loss of diversity by genetic drift and inbreeding depression. Eight from nine analyzed populations has suffered a recent genetic bottleneck. The dendrogram and Bayesian analysis revealed the formation of two clusters, separating two populations from the other. No statistical difference was detected in the genetic diversity rates between adults and young trees in two analyzed fragments. However, high levels of inbreeding, genetic drift and the linkage disequilibrium persist in the young individuals altering the genetic structure of these populations. The results showed that it is necessary a conservation and management program for all populations of *C. gonocarpum*.

Key words: Genetics of populations. Genetic variability. Habitat fragmentation. Inbreeding. SSR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1** – *Chrysophyllum gonocarpum*; a) Indivíduo adulto; b) tronco; c) folhas e d) frutos16
- Figura 3.1** – Mapa de localização dos nove locais de coletas de indivíduos de *Chrysophyllum gonocarpum* distribuídos em fragmentos na Mata Atlântica32
- Figura 3.2** – Gráfico dos valores logarítmicos da probabilidade média posterior (LnP(D)) por agrupamentos (K) e abaixo estrutura genética de nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* distribuídos em fragmentos da Mata Atlântica inferido pela abordagem Bayesiana. O eixo y indica a porcentagem de associação estimada em cada um dos k clusters inferidos45
- Figura 3.3** – Dendrograma do agrupamento de nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* localizadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica, conforme distância genética de Nei (1978) e agrupados pelo método de UPGMA.....46
- Figura 3.4** – Gráfico dos valores logarítmicos da probabilidade média posterior (LnP(D)) por agrupamentos (K) e abaixo estrutura genética evidenciada para as diferentes grupos de indivíduos adultos e jovens de *Chrysophyllum gonocarpum* em dois fragmentos da Mata Atlântica, Londrina e Cornélio Procópio50
- Figura 3.5** – Dendrograma do agrupamento de diferentes grupos de indivíduos jovens e adultos de *Chrysophyllum gonocarpum* em dois fragmentos distribuídos na Mata Atlântica, conforme distância genética de Nei (1978) e agrupados pelo método de UPGMA.....50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** – Localização, tamanho e formação florestal dos nove fragmentos de Mata Atlântica onde foram coletados indivíduos de *Chrysophyllum gonocarpum*.....31
- Tabela 3.2** – Relação de *primers* utilizados na análise de diversidade e estrutura genética de nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* localizadas em fragmentos da Mata Atlântica35
- Tabela 3.3** – Identificação e caracterização de dois locos de microssatélites acessados em 48 indivíduos de *Chrysophyllum gonocarpum*.....38
- Tabela 3.4** – Número de alelos encontrados em cada população de *Chrysophyllum gonocarpum* coletados em nove fragmentos distribuídos na Mata Atlântica obtidos com oito locos microssatélites39
- Tabela 3.5** – Índices de diversidade genética de oito locos microssatélites em nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* coletadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica40
- Tabela 3.6** – Presença de desequilíbrio de ligação para oito locos de microssatélites em nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* coletadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica41
- Tabela 3.7** – Análise de variância molecular (AMOVA) de nove populações de *Chrysophyllum gonocarum* coletadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica41
- Tabela 3.8** – Diferenciação genética aos pares com nove populações de *Chrysophyllum gonocarum* coletadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica (abaixo da diagonal) e distância genética (acima da diagonal)42
- Tabela 3.9** – Médias das distribuições a *posteriori* das proporções de indivíduos não-migrantes e migrantes para as nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* coletadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica.43

Tabela 3.10 – Teste do sinal para o excesso/deficiência de heterozigotos em nove populações de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> coletadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica	44
Tabela 3.11 – Índices de diversidade genética em indivíduos jovens e adultos de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> em dois fragmentos da Mata Atlântica	47
Tabela 3.12 – Teste do sinal para o excesso/deficiência de heterozigotos em quatro grupos de indivíduos jovens e adultos de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> em dois fragmentos da Mata Atlântica, Londrina e Cornélio Procópio	47
Tabela 3.13 – Diferenciação genética entre indivíduos adultos e jovens de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> em dois fragmentos da Mata Atlântica, Londrina e Cornélio Procópio	48
Tabela 3.14 – Diferenciação genética (F_{ST}) aos pares de grupos de adultos e jovens de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> em dois fragmentos da Mata Atlântica, Londrina e Cornélio Procópio	48
Tabela 3.15 – Presença de desequilíbrio de ligação para oito locos de microssatélites em indivíduos jovens e adultos de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> em dois fragmentos da Mata Atlântica, Londrina e Cornélio Procópio	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	ESPÉCIE ESTUDADA	15
2.2	EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO NA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PLANTAS	17
2.3	DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES	19
2.4	MARCADORES MOLECULARES NOS ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA	22
3	ARTIGO: Estrutura Genética em Populações de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) por Marcadores Microsatélites	25
3.1	RESUMO	26
3.2	ABSTRACT	27
3.3	INTRODUÇÃO.....	27
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.4.1	Espécie Estudada	29
3.4.2	Coleta do Material Foliar e Extração de DNA	29
3.4.3	Desenvolvimento de <i>primers</i> para Regiões Contendo Microsatélites para <i>Chrysophyllum gonocarpum</i>	32
3.4.4	Amplificação dos Locos de Microsatélites em Nove Populações de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i>	34
3.4.5	Análise Estatística.....	36
3.4.5.1	Caracterização dos locos de microsatélites desenvolvidos	36
3.4.5.2	Diversidade e estrutura genética de populações	36
3.5	RESULTADOS	37
3.5.1	Desenvolvimento e Caracterização dos <i>primers</i>	37
3.5.2	Diversidade e Estrutura Genética de Populações.....	38
3.5.3	Comparação da Variabilidade Genética entre Plantas Adultas e Jovens de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i>	46
3.6	DISCUSSÃO.....	51
3.6.1	Diversidade Genética em <i>Chrysophyllum gonocarpum</i>	51

3.6.2	Estrutura Genética de Populações em <i>Chrysophyllum gonocarpum</i>	54
3.6.3	Comparação entre Indivíduos Adultos e Jovens de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i>	56
4	CONCLUSÃO	58
	AGRADECIMENTOS	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A fragmentação florestal reduz áreas de vegetação contínua em paisagens compostas de pastagens, agricultura e fragmentos florestais de diversos formatos e tamanhos. O isolamento destes fragmentos pode afetar processos genéticos como deriva genética, fluxo gênico, seleção e sistema de reprodução (YOUNG; BOYLE, 2000). Uma das consequências em curto prazo da fragmentação de grandes áreas florestais é uma redução no tamanho populacional, devido à perda de indivíduos, podendo resultar na perda imediata de alelos (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996). Além disso, a fragmentação possui outras consequências como o aumento da endogamia. Esta por sua vez, em populações alógamas pode resultar no acúmulo de alelos deletérios recessivos e conseqüentemente menor fecundidade, aumento da mortalidade de sementes e plântulas, redução da taxa de crescimento dos indivíduos, levando possivelmente as populações à extinção (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996; REED, 2005).

Devido à intensa fragmentação de habitats houve um crescente interesse em avaliar as consequências genéticas decorrentes da fragmentação em populações de espécies arbóreas tropicais (BITTENCOURT; SEBBENN, 2008; TARAZI; MANTOVANI; REIS, 2009; MOREIRA et al., 2009; CONSON et al., 2013). Esse maior interesse no conhecimento da diversidade genética em populações em áreas fragmentadas tem levantado questões sobre a redução da diversidade genética e conseqüentemente sobre a redução da capacidade de adaptação das populações, estratégias de conservação e manejo de espécies, as quais demandam informações sobre a variabilidade genética de populações naturais (KAGEYAMA et al., 2003; TARAZI; MANTOVANI; REIS, 2009).

As árvores devido ao seu grande porte e longevidade, são organismos considerados chaves nos ecossistemas florestais (RAJORA et al., 2000) e o conhecimento do fluxo gênico e estrutura genética de populações são elementos essenciais para prever os efeitos gerados pela fragmentação. Conseqüentemente, estes dados auxiliam nas decisões sobre os meios efetivos para a preservação e o uso sustentável dos diferentes ecossistemas.

Chrysophyllum gonocarpum (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. é uma espécie arbórea pertencente à família Sapotaceae, conhecida comumente como guatambu, que pode atingir cerca de 20 metros de altura e podendo alcançar até 60

cm de diâmetro de caule (LORENZI, 2002). A distribuição de *C. gonocarpum* é de forma irregular em fundos de vale e início de encostas ou em terrenos planos onde o solo contém maior teor de umidade, desde o Rio de Janeiro e Minas Gerais até o Rio Grande do Sul e estende-se ao Uruguai, Argentina e Paraguai (REITZ, 1968; LORENZI, 2002). *Chrysophyllum gonocarpum* é uma árvore de dossel tolerante a sombra (BIANCHINI et al., 2010) com flores hermafroditas e frutos zoocóricos (FELIPPI et al., 2008). Esta espécie possui grande quantidade de frutos, muito apreciado por pássaros, razão pela qual não pode faltar na composição de floretas heterogêneas destinadas a recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 2002).

Nos últimos anos, várias técnicas de diferentes marcadores moleculares têm sido utilizadas em estudos de genética de populações de espécies arbóreas naturais ou fragmentadas. Considerando as diferentes técnicas moleculares disponíveis, os marcadores microssatélites tem apresentado grande importância devido ao grande conteúdo genético informativo por loco. Sendo utilizado em diversos trabalhos de diversidade e estrutura genética de populações arbóreas tropicais de diversos biomas brasileiros tais como: *Caryocar braziliense* (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001), *Theobroma cacao* (MOTAMAYOR et al., 2002) *Swietenia macrophylla* (NOVICK et al., 2003), *Hymenaea stignocarpa* (MORAES; KAGEYAMA; SEBEN, 2007), *Tabebuia ochracea* (MOREIRA; FERNANDES; COLLEVATI, 2009) e *Luehea divaricata* (CONSON et al., 2013).

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi utilizar marcadores moleculares microssatélites para estudo da estrutura genética de populações da espécie arbórea *C. gonocarpum*. Os objetivos específicos incluem: a) desenvolvimento de *primer* para locos de microssatélites adicionais para *C. gonocarpum*; b) aplicar a técnica de Microssatélites para investigar a estrutura genética de nove populações de *C. gonocarpum*, que ocorrem nas porções sul e sudeste da Mata Atlântica no Brasil, c) Comparar a diversidade genética encontrada em indivíduos jovens e adultos de alguns fragmentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESPÉCIE ESTUDADA

Chrysophyllum gonocarpum (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. está classificada taxonomicamente na ordem Ebenales, família Sapotaceae. A família Sapotaceae é constituída por 53 gêneros e cerca de 1.100 espécies, distribuídas principalmente nas regiões subtropicais e tropicais, ocorrendo preferencialmente em florestas úmidas, com principal centro de diversidade na América tropical (PENNINGTON, 2004).

Na América do Sul, a família Sapotaceae é altamente diversa nas florestas da Venezuela, Guianas, Amazônia brasileira, nos Andes da Colômbia, Equador e Peru, e também em toda costa do Brasil (GIULIETTI et al., 2009). Os representantes da família são árvores ou arbustos, monóicos ou dióicos, lactescentes (PENNINGTON, 2004). No Brasil, estima-se que ocorram cerca de 207 espécies distribuídas em 12 gêneros, geralmente encontradas em matas, cerrados e na caatinga, porém sua maior diversidade é na floresta amazônica (GIULIETTI et al., 2009).

Dentre seus principais gêneros, destacam-se *Pouteria* Aubl. e *Chrysophyllum* L., devido ao maior número de espécies encontrado nestes gêneros. O gênero *Chrysophyllum*, possui cerca de 70 espécies, sendo representado no Brasil por 31 espécies (14 endêmicas) segundo Judd et al. (1999). *Chrysophyllum gonocarpum* é conhecida vulgarmente como gumbixava, aguai-da-serra, caxeta, caxeta amarela, peroba branca, guaca, aguai, mata-olho, guatambu-sapo, guatambu-de-leite (BARBOSA et al., 1977), aguai doce, aguai-moroti, alto bravo ou pêssego do mato.

Chrysophyllum gonocarpum é uma espécie arbórea de 6 a 20 metros de altura, podendo alcançar até 60 cm de diâmetro de caule (LORENZI, 2002). Porém, Bianchini, Pimenta e Santos (2006) verificaram que no Parque Estadual Mata dos Godoy, os indivíduos adultos podem atingir mais 20 m de altura e 80 cm de diâmetro à altura do peito (DAP). Esta espécie ocorre de forma irregular em fundos de vale e início de encostas ou em terrenos planos onde o solo contém maior teor de umidade que vão desde o Rio de Janeiro e Minas Gerais até o Rio Grande do Sul e estende-se ao Uruguai, Argentina e Paraguai (REITZ, 1968).

Figura 2.1 – *Chrysophyllum gonocarpum*; a) Indivíduo adulto; b) tronco; c) folhas e d) frutos.



Fonte: a) Rodrigues, L. A. b) e c): Herbário Florestal da Universidade Federal Santa Maria, 2012 e d) Fonte: Copaíba: Em defesa da Mata Atlântica, 2012.

As folhas de *C. gonocarpum* são simples, largamente obtusas, arredondadas ou emarginadas. Os frutos são amarelos, com polpa fina, possuindo de 1-5 sementes (REITZ, 1968) (Figura 2.1). Esta espécie possui grande quantidade de frutos, muito apreciado por pássaros, razão pela qual não pode faltar na composição de floretas heterogêneas destinadas a recuperação de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 2002).

Conforme Felippi et al. (2008), *C. gonocarpum* possui inflorescências constituída por grupos de pequenas flores branco-esverdeadas. Floração abundante, porém irregular, ou seja, não ocorre floração todos os anos com influência ambiental na taxa de aborto das flores, como é o caso de ambientes mais secos. A polinização é realizada por insetos no período de setembro a dezembro. A frutificação é abundante, porém irregular, onde, nem todas as árvores florescem todos os anos. A dispersão é zoocórica (mamalio, mirmeco e ornitocórica) durante o

período de maio a novembro. O processo germinativo é relativamente lento e desuniforme, entretanto Bianchini, Pimenta e Santos (2006) verificaram que a dispersão de *C. gonocarpum* no início do período chuvoso possibilita maior sucesso na germinação das sementes e no estabelecimento das plântulas.

Chrysophyllum gonocarpum é uma árvore de dossel tolerante a sombra (BIANCHINI et al., 2010), com padrão espacial aleatório para indivíduos adultos (BIANCHINI et al., 2003), apresenta tolerância relativa ao alagamento, e apresenta preferência por habitats com inundações esporádicas (BIANCHINI et al., 2003) . Segundo Lorenzi (2002), *C. gonocarpum* é irregularmente distribuída em fundo de vales e início de encostas e em terrenos planos, onde o solo contém maior teor de umidade.

Chrysophyllum gonocarpum possui importância econômica e paisagística, sendo que sua madeira é empregada na confecção de brinquedos, caixas, carretéis, forros e tábuas para revestimentos de casas (REITZ, 1968; LORENZI, 2002), cabos de ferramentas, móveis, lenha (BARBOSA et al., 1977; MARCHIORI, 2000; KUERA et al., 2002), podendo também ser empregada na arborização urbana, principalmente de ruas estreitas (REITZ, 1968; LORENZI, 2002).

Devido a sua importância econômica, paisagística e ecológica nos locais de ocorrência, *C. gonocarpum* é indicada na composição de florestas heterogêneas destinadas a recomposição de áreas degradadas (REITZ, 1968; LORENZI, 2002). Principalmente em recuperação de ambientes ripários, no qual, possui destaque conforme demonstrado no estudo fitossociológico realizado por Bianchini et al. (2003), em uma área alagável do Parque Estadual Mata do Godoy, Londrina, Paraná, onde *C. gonocarpum* foi uma das espécies com alto valor de importância neste tipo de ambiente.

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 em decorrência de subdivisões em fragmentos menores e consequente isolamento destes (FAHRIG, 2003). A formação de fragmentos ou manchas de florestas ocorre a milhares de anos devido a eventos naturais como

glaciações, terremotos, furacões, deslizamentos, erupções de vulcões em um processo contínuo e lento, que por isolamento tendem a levar espécies à evolução ou à extinção por meio da seleção natural. Entretanto, com o crescimento populacional humano, construções civis, indústria, o homem tem fragmentado o ambiente em pequenos remanescentes numa velocidade muito rápida. Desta maneira, as atividades humanas estão causando extinção em uma taxa superior a taxa de reposição das espécies (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A mudança na vegetação devido à fragmentação, com a formação de manchas remanescentes, entremeadas por uma vegetação diferenciadas, e/ou de usos diversos traz inúmeras consequências. Nestes remanescentes as bordas por estarem expostas a alterações bióticas, abióticas e ecológicas, bem como a migração de alelos. (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). A intensidade destas consequências está relacionada com o tamanho, a forma e a posição do fragmento na paisagem (SAUNDERS et al., 1991).

As fragmentações tendem a limitar populações de plantas na dispersão de sementes, polinização, colonização, isolamento geográfico podendo levar a destruição de populações inteiras (ANJOS, 1998). Além disso, a fragmentação pode causar quebras nas interações ecológicas (LIMA, 2012), pois as populações possuem relações tanto entre e dentro de indivíduos da própria espécie como entre indivíduos de outras espécies, como por exemplo, plantas e seus polinizadores. Desta maneira, 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 (SHAFFER, 1981; MENGES, 1991). Uma vez que, em plantas isoladas, na presença de seus polinizadores, tende a aumentar a distância na dispersão do pólen, porém este aumento está atrelado a poucos doadores de alelos, ocasionando em futuros gargalos genéticos (HANSON et al., 2008).

Desta maneira a abundância e o comportamento dos polinizadores podem afetar o fluxo gênico, refletindo diretamente na taxa de cruzamento e no tamanho da população de plantas (KARRON et al., 1995), levando a perda de diversidade dentro dos fragmentos (MILLIGAN et al., 1994)

A perda da diversidade genética tem implicações quanto à persistência de espécies e populações. Com baixos níveis de variação genética, elas se tornam vulneráveis a extinção devido a fatores estocásticos e a redução do valor

adaptativo, que diminui a capacidade das espécies em responder às mudanças ambientais futuras (FALCONER, 1996). Sendo assim, quanto maior a variabilidade genética presente na população, maiores serão as chances da espécie perdurar naquele ambiente.

A fragmentação produz uma redução imediata no número de alelos, devido a uma redução populacional (CASCANTE et al., 2002). Populações remanescentes pequenas ou flutuações populacionais, caso permaneçam isoladas por muitas gerações resultam em fixação de alelos e consequente perda de diversidade genética devido à deriva genética, diminuindo a variabilidade dentro de populações e aumentando a diferenciação entre populações (BARRETT; KOHN, 1991).

Além da deriva genética é importante salientar que em pequenos fragmentos florestais, as populações de plantas, principalmente árvores, ainda podem sofrer com os cruzamentos endogâmicos. Isto porque, independente de quais são os mecanismos de dispersão de pólen e sementes, o isolamento e a impossibilidade de colonizar novos ambientes aumenta a diferenciação genética entre populações, o que pode acarretar em uma maior probabilidade de endogamia (TARAZI; MANTOVANI; REIS, 2009).

Devido ao aumento da endogamia, outra consequência seria a depressão endogâmica, ou seja, a redução do desempenho reprodutiva da espécie devido ao cruzamento entre indivíduos aparentados (TEMPLETON et al., 1990; SEOANE; KAGEYAMA; SEBBEN, 2000).

Embora nos fragmentos pequenos as populações sofram maiores consequências em sua diversidade genética, foi observado por Ranta et al. (1998) que os fragmentos florestais pequenos podem ser muito importantes. Estes fragmentos quando próximo de 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 os fluxos entre estes fragmentos.

2.3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Diversidade genética refere-se aos níveis de variação genética dentro de populações e como esta variação está dividida entre populações (HAMRICK, 1983). A existência de diversidade genética dentro de populações é uma

condição fundamental para que a evolução ocorra. Conforme Torggler et al. (1995), a seleção natural atua sobre a variabilidade dentro das populações em relação a adaptação ao ambiente, proporcionando variabilidade entre populações e por fim variabilidade entre espécies.

Vários processos naturais podem reduzir ou aumentar a diversidade genética dentro de populações naturais. Os processos que podem introduzir variabilidade continuamente nas populações são basicamente dois: mutação e migração, e esta pode ser perdida por deriva genética, cruzamentos endogâmicos e seleção natural (COLE, 2003).

O aumento dos níveis de diversidade genética a partir da ocorrência de mutações restringe-se a uma perspectiva 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 é o movimento de genes, incluindo todos os movimentos de gametas, propágulos e indivíduos, no qual introduz variabilidade genética dentro das populações e reduz a diferenciação genética entre elas, homogeneizando as frequências alélicas (HARTL; CLARK, 2007).

Dentro dos processos que podem reduzir a diversidade genética está a deriva genética, que caracteriza-se pela oscilação das frequências alélicas de forma aleatória ao longo do tempo (HARTL; CLARK, 2007). A deriva genética pode atuar de diversas formas, podendo aparecer em diferentes momentos da história evolutiva da população. Como é o caso do efeito fundador e gargalo genético, no qual a oscilação da frequência alélica de uma nova população depende do tamanho da contribuição derivada da população original. Outra forma da deriva genética atuar é reduzindo o tamanho amostral de alelos existentes, ou seja, o tamanho amostral de alelos pode ser reduzido diante de uma diminuição na quantidade de gametas de genitores afetando a frequência alélica da próxima geração (Seoane et al., 2005). Além disso, diferenças no sucesso reprodutivo reduzem a probabilidade de encontro dos gametas existentes na população reduzindo seu tamanho amostral. Independente da forma como ocorre a deriva genética, a principal consequência é a redução do tamanho populacional e consequente redução da diversidade genética (BARRETT; KOHN, 1991).

A endogamia é outro processo que reduz a diversidade genética, principalmente em populações pequenas, devido a uma maior probabilidade de

autofecundação e cruzamentos entre indivíduos aparentados (KAGEYAMA et al., 1998). A endogamia age diminuindo a heterozigiosidade, o que em curto prazo pode causar redução no desempenho e da viabilidade individual. A endogamia ainda pode, em longo prazo, limitar a habilidade da espécie para responder a mudanças ambientais e incrementar a susceptibilidade a pragas e doenças e a fixação de alelos deletérios. Isto ocorre principalmente em espécies que tiveram o tamanho de suas populações reduzido, como nos processos de fragmentação intensa do habitat original (ISAGI et al., 2007).

A distribuição da variabilidade genética nas populações naturais depende também de outros fatores que são intrínsecos à espécie, como o mecanismo de dispersão de pólen e sementes, o modo de reprodução, o sistema de cruzamento, bem como alguns fatores ambientais que possam influenciar ou direcionar de forma agregada essa distribuição (KEVIN et al., 2004; LUNA; EPPERSON; OYWAMA, 2005; MARQUARDT; EPPERSON, 2004).

Considerando que a variabilidade genética é a condição principal para evolução, o conhecimento sobre a amplitude e distribuição desta variabilidade é fundamental para acessar o potencial evolutivo de populações e espécies de plantas. (SILVERTOWN; DOUST, 1993). Além disso, este conhecimento tem sido utilizado como ferramenta para auxiliar nas estratégias de manejo e de conservação genética em diversos estudos, como nas espécies *Lavandula multifida* (HNIA; MOHAMED, 2010), *Limnanthes vinculans* (SLOOP; EBERL; AYRES, 2012).

Vários autores têm utilizado a técnica de marcadores moleculares para acessar a variabilidade genética em populações naturais (ALVES et al., 2007; HARDESTY et al., 2010; SLOOP; EBERL; AYRES, 2012, CONSON et al., 2013). Os parâmetros mais utilizados para quantificar a variação genética são as proporções de locos polimórficos dentro de espécies (P_e) e dentro de populações (P_p) e a diversidade geral de espécie (H_e) e de populações (H_p) (HAMRICK, 1994).

O padrão espacial ou a estrutura genética dentro de populações é também um componente importante dentro dos processos genético-ecológicos e evolutivos de populações (EPPERSON, 1990). A estrutura genética de populações pode ser avaliada utilizando-se diversas metodologias, entre elas estão: coeficiente de coancestralidade de Cockerham (COCKERHAM, 1969; VENCOVSKY, 1992; WEIR, 1996), que fornece a distribuição da variabilidade genética em diversos níveis hierárquicos; as estimativas da diversidade genética de Nei (1973; 1978), que

fornece a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações (GONZALES; HAMRICK, 2005; LEE et al., 2002); estatísticas F de Wright (WRIGHT, 1965), que possibilitam identificar níveis médios dos índices da fixação alélica para o total de populações (F_{IT}), dentro da população (F_{IS}), e a divergência genética entre populações (F_{ST}) (MORAES; MONTEIRO; VENCOVSKY, 1999; YEEH; KANG; CHUNG, 1996).

2.4 MARCADORES MOLECULARES NOS ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA

Existem muitas maneiras de acessar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma determinada espécie. O mais simples indicador de variabilidade genética é a variabilidade morfológica, e esta teve grande importância no desenvolvimento das teorias de Mendel, teorias sobre ligações gênicas, identificação de espécies e cultivares e na construção dos primeiros mapas genéticos (STEINER; GREENE, 1996). Porém este indicador pode sofrer influência do ambiente, apresentando variação contínua, grande plasticidade e um número reduzido de características que possam ser avaliadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Neste sentido, as técnicas de biologia molecular que tiveram seu desenvolvimento inicial a partir da década de 1960 com os marcadores isoenzimáticos vieram para auxiliar na solução destes problemas. O polimorfismo destes marcadores isoenzimáticos é devido a mutações na sequência gênica que alteram a carga elétrica de algumas proteínas com função enzimática (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Este polimorfismo é detectado a partir da eletroforese das amostras de proteína que permite a visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos. Este tipo de marcador ainda é utilizado no estudo de genética de populações (KAGEYAMA et al., 2003; MELO JÚNIOR et al., 2004; MARTINS et al., 2008), entretanto a análise por isoenzimas apresenta algumas desvantagens com relação às demais técnicas de caracterização utilizadas atualmente.

As isoenzimas são produtos da expressão gênica, logo, altamente influenciadas pelo ambiente. A atividade enzimática é também altamente influenciada pela idade da planta, pois os genes que controlam a sua expressão manifestam-se em determinados estádios do desenvolvimento e em órgãos e tecidos específicos (RAMÍREZ; CALDERON; ROCCA, 1991). Sendo assim para uma

melhor e mais segura determinação da variabilidade genética é necessário utilizar características que não sofram influências do meio ambiente como os marcadores moleculares de DNA (ácido desoxirribonucleico) (PARKER et al., 1998).

Os avanços na biologia molecular possibilitaram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e para os estudos de biologia populacional, como por exemplo, os marcadores moleculares. Estes se referem a diferenças observadas nas sequências de nucleotídeos do DNA e podem ser classificados como dominantes e codominantes. A técnica de marcadores moleculares permite a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcas cobrindo todo o genoma do organismo e tem se tornado uma forma eficiente de gerar informações para um grande número de indivíduos, populações e espécies (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O primeiro marcador que detecta polimorfismo diretamente no DNA surgiu na década de 1970, o marcador RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Este marcador consiste no uso de enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos na sequência de DNA, clivando-os e gerando fragmentos de tamanho e número variáveis e a detecção do polimorfismo é realizada através de *Southern blot* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Por se tratar de uma técnica de grande morosidade e a necessidade de aplicação em um grande número de indivíduos, este marcador não foi muito difundido em estudos de genéticas de populações.

Com surgimento da técnica de PCR na década de 80 desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), permitiu a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, que provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular. O uso das técnicas de PCR na análise genética permite um melhor entendimento de processos de especiação, padrões de biogeografia ao nível de espécie, bem como a estrutura genética de populações. Os marcadores de DNA mais utilizados em estudos genéticos de plantas são o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e os SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites ou sequência simples repetida (SSRs - *Simple Sequence Repeats*) são marcadores co-dominantes, multialélicos, altamente informativos, são baseados em PCR, reprodutíveis, com ampla cobertura do genoma

(FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Todas essas características tornam a utilização deste marcador vantajosa, fazendo com que este possa ser considerado um marcador ideal. Os microssatélites são uma subclasse de DNA repetitivo, formado por pequenas sequências (2 a 7 nucleotídeos) repetidas várias vezes de maneira idêntica e adjacente (repetição em tandem).

Os SSRs são ainda automatizáveis em sistemas *multiplex*, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos em curto prazo (AZEVEDO, 2007). Por suas características vantajosas, os marcadores microssatélites têm sido utilizados em estudos de diversidade de populações naturais (ALVES et al., 2007; MOREIRA; FERNANDES; COLLEVATTI, 2009; HARDESTY et al., 2010; CONSON et al., 2013).

3 ARTIGO*

RODRIGUES, Luana Alves

**Estrutura genética em populações de *Chrysophyllum
gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae)
por marcadores microssatélites**

* Este artigo será submetido a revista American Journal of Botany

3.1 RESUMO

Proposta do estudo: Avaliar a estrutura e diversidade genética na espécie arbórea tropical *Chrysophyllum gonocarpum* em nove fragmentos localizados na Mata Atlântica e comparar a diversidade genética entre jovens e adultos em dois fragmentos.

Métodos: Foram utilizados oito locos de microssatélites em nove populações de indivíduos adultos de *C. gonocarpum* distribuídos nas regiões sul e sudeste do Brasil. Em duas populações comparou-se também a variabilidade genética entre indivíduos jovens e adultos.

Resultados: Todas populações apresentaram heterozigosidade observada menor em relação a heterozigosidade esperada, evidenciado pelos elevados valores de endogamia. Foi observado a presença de vários locos em desequilíbrio de ligação. A análise de variância molecular mostrou que a maior parte da variação genética se encontra dentro de populações e indivíduos. Não houve correlação com as distâncias genéticas e geográficas. Foi observado efeito recente de gargalo genético em oito populações das nove analisadas. Verificamos diferentes taxas de migração entre as populações. Não houve diferença estatística entre os índices de diversidade genética entre adultos e jovens. Entretanto, elevados níveis de endogamia, deriva genética e desequilíbrio de ligação persistiram nos indivíduos jovens, alterando a estrutura genética destas populações.

Conclusões: *Chrysophyllum gonocarpum* mostrou níveis moderados de diversidade genética nas populações analisadas. A manutenção a longo prazo da diversidade está comprometida devido aos efeitos da endogamia e gargalo genético, confirmados pela ocorrência de muitos locos em desequilíbrio de ligação tanto nos indivíduos adultos quanto nos jovens. Sendo assim, estratégias de conservação devem ser adotadas.

Palavras chaves: Diversidade genética. Desequilíbrio de ligação. Endogamia. Estrutura genética. Fragmentação. Gargalo genético.

3.2 ABSTRACT

Premise of the study: Evaluate the structure and genetic diversity in the tropical tree *Chrysophyllum gonocarpum* in nine fragments from Atlantic Rainforest and make a comparison of genetic variability among young and adult trees belonging to two fragments.

Methods: Eight microsatellite loci were used in nine fragments of adult trees of *C. gonocarpum* distributed in southern and southeastern regions from Brazil. In two fragments the genetic variability between young and adult trees were compared.

Results: For all the populations the observed heterozygosity was lower than the expected heterozygosity, evidenced by high levels of inbreeding coefficient. The presence of several loci in linkage disequilibrium was also observed. The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) showed that most of the genetic variation was found within populations and individuals. No correlation was observed between genetic and the geographic distances. Recent genetic bottlenecks were observed in eight of the nine populations studied, and different levels of genetic migrations among the populations were determined. There was no statistical differences between the level of genetic variability from young and adult trees. However, high levels of inbreeding, genetic drift and the linkage disequilibrium persisted in the young individuals, altering the genetic structure of these populations.

Conclusions: *Chrysophyllum gonocarpum* showed a moderate level of genetic diversity in the studied populations and the maintenance in a long-term time of genetic variability is committed due to the effects of the inbreeding and genetic bottleneck. The analysis of genetic variation in young and adults trees showed a high level of inbreeding and a improve of linkage disequilibrium in the young populations. Thus, conservations strategies should be adopted for the maintenance of genetic variability and the survival of these populations in a long-term time.

Key words: Genetic diversity. Linkage disequilibrium. Inbreeding. Genetic structure. Forest fragmentation. Genetic bottleneck.

3.3 INTRODUÇÃO

A fragmentação de áreas florestais anteriormente contínuas reduz o tamanho populacional e aumenta o isolamento destes fragmentos, no qual pode alterar a estrutura demográfica, sistemas de acasalamento, diversidade genética e viabilidade a longo prazo de espécies de árvores na floresta (GHAZOUL 2005; LOWE et al. 2005).

O isolamento de populações de árvores em pequenos fragmentos pode afetar processos genéticos como deriva genética, fluxo de genes, seleção e sistema de reprodução (YOUNG; BOYLE, 2000), além de poder isolar reprodutivamente populações e alterar a estrutura genética dentro das populações. Com isto, populações pequenas e isoladas tendem a ter redução do número de

alelos em razão da ação da deriva genética, endogamia, devido ao tamanho efetivo reduzido e baixo fluxo gênico em consequência do isolamento destes fragmentos (FRANKHAM, 2003).

Vários são os efeitos da fragmentação sobre as populações, como a redução do sucesso reprodutivo devido ao declínio da riqueza e abundância de polinizadores em áreas fragmentadas (CASCANTE et al., 2002; QUESADA et al., 2004). Além disso, a fragmentação pode também influenciar na dispersão de sementes, devido a mudanças na abundância, riqueza e no comportamento dos animais dispersores (GHAZOUL et al., 2005)

Sendo assim as mudanças populacionais associadas à degradação de habitats podem afetar a viabilidades das populações a curto e longo prazo. A curto prazo, nas populações, pode ocorrer o aumento da susceptibilidade a doenças e pestes e fixação de alelos deletérios (BARRET; KOHN, 1991; ISAGI et al., 2007). Em longo prazo, a perda da diversidade genética deve reduzir a capacidade das populações a responderem as mudanças das pressões seletivas (FUTUYMA, 2005).

As florestas tropicais têm sofrido com a fragmentação de habitat ao longo do tempo desde o século passado, devido principalmente a desmatamento para a agricultura e extensa exploração madeireira. A Mata Atlântica, por exemplo, é um dos biomas mais importantes, com elevado nível de endemismo (CARNAVAL, et al., 2009) e tem sofrido uma intensa fragmentação. Originalmente a Mata Atlântica apresentava uma área de 1.315.460 km² e atualmente só lhe resta cerca de 8,5% em remanescentes florestais acima de 100 ha (SOS, Fundação Mata Atlântica, 2012).

Vários trabalhos têm reportado os efeitos da fragmentação na diversidade e estrutura genética de populações de árvores (GHAZOUL 2005; LOWE et al. 2005, FINGER et al., 2012), entretanto os trabalhos sobre os efeitos da fragmentação em espécies arbóreas na Mata Atlântica ainda são poucos. Conson et al., (2013) verificaram efeitos da fragmentação na Mata Atlântica como perda de diversidade genética devido a deriva genética e endocruzamento em *Luehea divaricata*.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar por marcadores de microssatélites, se a fragmentação provocou a perda de diversidade genética em nove populações de plantas adultas de *C. gonocarpum*, que ocorrem nas porções sul e sudeste da Mata Atlântica no Brasil. Além disso, comparar a

diversidade e estrutura genética encontrada em indivíduos jovens e adultos em duas populações utilizando estes mesmos marcadores moleculares.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Espécie Estudada

Chrysophyllum gonocarpum (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl., pertencente da família Sapotaceae, é uma espécie arbórea de dossel tolerante a sombra (BIANCHINI et al., 2010) que pode atingir cerca de 20 metros de altura (LORENZI, 2002). Possui flores hermafroditas e os frutos são dispersos por animais (FELIPPI et al., 2008). *Chrysophyllum gonocarpum* ocorre em fundos de vale e início de encostas ou em terrenos planos com solos mais úmidos, nas porções sul e sudeste do Brasil estendendo-se ao Uruguai, Argentina e Paraguai (REITZ, 1968, LORENZI, 2002). Esta espécie possui importância econômica e paisagística, sendo que sua madeira é empregada na confecção de brinquedos, caixas, carretéis, forros e tábuas para revestimentos de casas (REITZ, 1968; LORENZI, 2002), cabos de ferramentas, móveis, lenha (BARBOSA et al., 1977; MARCHIORI, 2000; KUERA et al., 2002), podendo também ser empregada na arborização urbana, principalmente de ruas estreitas (REITZ, 1968; LORENZI, 2002).

3.4.2 Coleta do Material e Extração de DNA

Amostras de folhas de 323 indivíduos de *Chrysophyllum gonocarpum* foram coletadas em nove fragmentos de Floresta Mata Atlântica (Tabela 3.1). Em cada fragmento foram coletadas folhas jovens de cerca de 30 indivíduos adultos com exceção de dois fragmentos onde foram coletadas folhas de cerca de 60 indivíduos, sendo 30 indivíduos adultos e 30 indivíduos jovens. No total foram amostrados cinco fragmentos no estado do Paraná, dois fragmentos no estado do Rio Grande do Sul, um fragmento no estado São Paulo e um fragmento no estado de Minas Gerais (Tabela 3.1, Figura 3.1). Foram considerados indivíduos adultos, aquelas árvores que já tenham iniciado a fase reprodutiva e os indivíduos jovens, aqueles que não tenham iniciado esta fase. Para coleta dentro de cada fragmento manteve-se uma distância mínima de 10 m entre indivíduos. As amostras

de folhas foram coletadas e armazenadas em sílica gel para posterior extração do DNA.

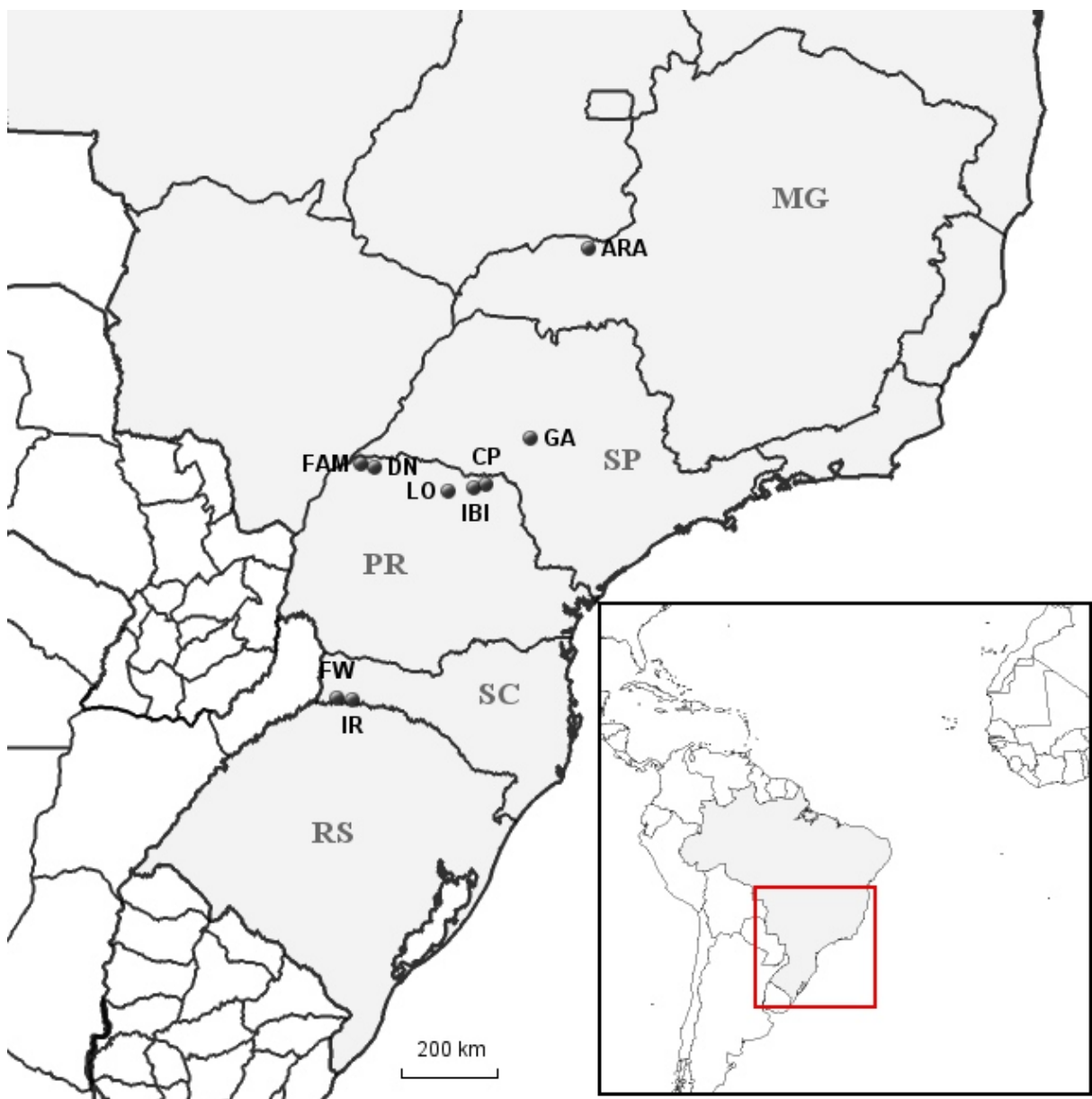
O DNA total foi extraído de tecido foliar de acordo com o protocolo CTAB - brometo de cetil trimetil amônio (DOYLE; DOYLE, 1987) com modificações. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A quantificação do DNA foi estimada por espectrofotometria, utilizando o equipamento ScanDrop (Analytikjena, Alemanha).

Tabela 3.1 – Localização, tamanho e formação florestal dos nove fragmentos de Mata Atlântica onde foram coletados indivíduos de *Chrysophyllum gonocarpum*.

Código	Cidade - Estado (Coordenada geográfica)	Área do fragmento (hectares)	N. de indivíduos	Formação Florestal
ARA	Araguari - MG Reserva Legal da Fazenda Mata da Água Fria (18°29'52"S 48°23'08"O)	500	30	Floresta Estacional Decidual
IBI	Ibiporã - PR Mata Doralice (23°17'96"S 50°59'38"O)	170	31	Floresta Estacional Semidecidual
DN	Diamante do Norte - PR Estação Ecológica de Caiuá. (22°37"S 52°51"O)	1449	30	Floresta Estacional Semidecidual
LO	Londrina - PR Parque Estadual Mata dos Godoy (23°27'S e 51°15'O)	675	25 A + 28J*	Floresta Estacional Semidecidual
CP	Cornélio Procópio - PR Parque Estadual Mata São Francisco (23°09'82"S 50°34'37"O)	832	30 A + 30J*	Floresta Estacional Semidecidual
FAM	Diamante do Norte - PR Fazenda Água Mole (22°38'10"S 52°49'36"O)	306	30	Floresta Estacional Semidecidual
GA	Gália – SP Estação Ecológica dos Caetetus. (22°24'11"S 49°42'05"O)	2178	29	Floresta Estacional Semidecidual
IR	Iraí – RS (27°11'93"S 53°14'97"O)	360	30	Floresta Estacional Decidual
FW	Frederico Westphalen - RS (27°22'27"S 53°25'43"O)	35	27	Floresta Estacional Decidual

*A e J - Indivíduos adultos e jovens.

Figura 3.1 – Mapa de localização dos nove locais de coletas de indivíduos de *Chrysophyllum gonocarpum* distribuídos em fragmentos na Mata Atlântica.



3.4.3 Desenvolvimento de *Primers* para Regiões Contendo Microssatélites para *Chrysophyllum gonocarpum*

Regiões contendo microssatélites foram isoladas, utilizando uma metodologia que tem como base hibridação e captura, seguindo o protocolo descrito por Billotte et al. (1999) com sondas (CT)₈ e (GT)₈ no passo de enriquecimento. Cerca de cinco µg de DNA genômico foi digerido utilizando a enzima de restrição

Rsal, e os fragmentos resultantes foram ligados a adaptadores *Rsal*-21 e *Rsal*-25 (EDWARDS et al., 1996).

Fragmentos que continham repetições GA e CA foram selecionados por hibridização com oligonucleotídeos biotinilados, complementares as sequências repetitivas e captura por esferas magnéticas cobertas por estreptavidina (*Invitrogen Dynal A. S.*, Lillestrom, Norway). Os fragmentos enriquecidos em microssatélites foram amplificados com o *primer Rsa-21* (PETERS et al., 2008), clonados em *pGEM-T Easy Vector* (*Promega*, Madison, WI, USA) e então, transformados em células competentes de *Escherichia coli* JM109 (*Promega*, Madison, WI, USA). As colônias de plasmídeos individuais foram isoladas e a sequência de cada inserto foi determinada utilizando o sequenciador *ABI PRISM 377* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA).

Os fragmentos sequenciados foram analisados utilizando o programa *Gramene markers database* (WARE et al., 2002) e os fragmentos que continham regiões de microssatélites com repetições de dinucleotídeos ou trinucleotídeos com quatro ou mais repetições foram utilizados para confecção dos *primers* em regiões que flanqueiam as regiões de microssatélites. Os pares de *primers* complementares as regiões flanqueadoras aos elementos repetitivos foram desenhados utilizando o programa *PRIMER3 web interface* (ROZEN; SKALETSKY 2000).

As amplificações com os respectivos *primers* foram realizadas em 48 indivíduos provenientes de três populações: Ibiporã, Paraná (30 indivíduos), Araguari, Minas Gerais (nove indivíduos), e Londrina, Paraná (nove indivíduos). As reações de amplificação foram conduzidas em um total de 10µl, contendo *Green Taq Master Mix* (*Promega*, Madison, WI, USA) 1X, 0,5µM de cada *primer* direto e reverso e 50 ng de DNA. As condições de termociclagem foram conduzidas conforme o ciclo touchdown descrito por Rodrigues et al. (2013). Os produtos amplificados de microssatélites foram previamente visualizados em gel a 7% de acrilamida:bis-acrilamidada (29:1) para verificação da amplificação e posteriormente foram submetidos a eletroforese capilar de acordo com protocolo proposto por Schuelke et al. (2000).

3.4.4 Amplificação dos Locos de Microssatélites em Nove Populações de *Chrysophyllum gonocarpum*

Foram utilizados seis *primers* de regiões de microssatélites desenvolvidos para *C. gonocarpum* descritos por Rodrigues et al. (2013) (Tabela 3.2) e foram desenvolvidos adicionalmente mais dois *primers* de microssatélites que também foram aplicados, totalizando oito locos de SSR (*Simple Sequence Repeat*).

A amplificação dos locos de microssatélites foi conduzida conforme estratégia proposta por Schuelke et al. (2000). Para isto, foi adicionado a extremidade 5' do *primer* direto uma cauda constituída de 18 nucleotídeos (5'-TGAAAACGACGGCCAGT-3') e foi sintetizada esta mesma sonda marcada com cada uma das três fluorescência (6-FAM, HEX e NED). Previamente, foi realizado um teste com os oito locos desenvolvidos por Rodrigues et al. (2013), dos quais dois locos não foram aplicados nas populações devido a presença de *stutter*, o que dificulta a análise dos alelos. Porém foram adicionados dois locos de microssatélites desenvolvidos neste trabalho na análise de diversidade e estrutura genética de populações.

As reações de amplificação foram conduzidas em um total de 5 μ l contendo *Green Taq Master Mix* 1X (*Promega*, Madison, WI, USA), 0,125 μ M de *primer* marcado com fluorescência, 0,125 μ M de *primer* reverso e 0,0125 μ do *primer* direto com a cauda e 50 ng de DNA. As condições de temperatura no termociclador foram conduzidas conforme proposto por Rodrigues et al. (2013) (Tabela 3.2). Os produtos amplificados dos locos de microssatélites com cada uma das três fluorescências (azul, verde e amarelo cores dos seguintes fluoróforos 6-FAM, HEX e NED, respectivamente) foram misturados, então diluídos 10X com água ultrapura. As amostras foram preparadas em 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 (*Life Technologies*, USA) e 8,8 μ L de formamida HI-DI (*Life Technologies*, USA).

Tabela 3.2 – Relação de *primers* utilizados na análise de diversidade e estrutura genética de nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* localizadas em fragmentos da Mata Atlântica.

<i>Primer</i>	<i>Primer direto (5'-3')</i>	<i>Primer Reverso (5'-3')</i>	<i>Motivo</i>	<i>Tamanho do alelo (pb)</i>	<i>TA</i>	<i>Autor</i>
Cgon12	CCCAACTCACACCATAGCAG	TGCGGACGAACAACACTGTACT	(AC) ₄ (CA) ₂	174-200	<i>Touchdown</i> (65-50)	
Cgon18	GAAGGTGATCAACCCACTTGA	GCGTAGGACTGCAGAGTGTG	(TA) ₄	190-220	<i>Touchdown</i> (65-50)	Rodrigues et al., 2013
Cgon51	GAGTGAGAAACCCGCCACT	TGCACACCCAAGGACTTGTA	(CA) ₅	158- 210	55	
Cgon52	ACTTGGCAATCACTCGCTCT	ACACGCATTTCTCGCTCTCT	(AG) ₄ ...(AG) ₄	160-210	<i>Touchdown</i> (65-50)	
Cgon57	CCAATCCAAAGCCTCTATGTG	ACAAATTTGATTGGCGTCGT	(AC) ₉	209-230	53	
Cgon76	AGTTCACCAGGACGATGTGG	CATCCTCAAGCAGCATAGCA	(TG) ₉	175-233	53	
Cgon122	GGGGATTTGGTGAAAAGGTT	TTTGTAAGGCTGGCATTTC	(CA) ₈	170-260	<i>Touchdown</i>	Desenvolvidos neste trabalho.
Cgon124	CGCGTGGACTAACATCAACT	GAGAGATGCTCGGGGTTTC	(GA) ₇	140-210	<i>Touchdown</i>	

TA – temperatura de anelamento

Posteriormente as amostras foram submetidas à eletroforese capilar com polímero POP-7™ (*Applied Biosystems*, USA) em sequenciador automático ABI 3500xL Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, USA). Após eletroforese capilar, utilizou-se o programa GeneMapper® Software v. 4.1 (CHATTERJI; PACHTER, 2006) para chamada dos alelos encontrados em cada loco.

3.4.5 Análise Estatística

3.4.5.1 Caracterização dos locos de microssatélites desenvolvidos

Para estimativa do número de alelos por loco (K), heterozigidade esperada (H_E) e observada (H_O) e o conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) foi utilizado o programa Cervus versão 2.0 (MARSHALL et al., 1998). Os desvios de equilíbrio de Hardy–Weinberg foram calculados a partir do programa Arlequin version 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

3.4.5.2 Diversidade e estrutura genética de populações

A estimativa da presença de alelos nulos foi realizada pelo método de Dempster, Laird e Rubin, (1977), utilizando o programa FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007). O número de alelos por população e número de alelos efetivos por população foram calculados utilizando o programa Popgene v. 1.31 (YEH; YANG; BOYLE, 1999). O teste exato de equilíbrio de Hardy–Weinberg (GUO; THOMPSON, 1992) e o desequilíbrio de ligação foram obtidos a partir do programa Genepop v.3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Os coeficientes de endogamia (F_{IS} - WRIGHT, 1965) para cada população foram calculados pelo programa FSTAT v. 2.9.3 (GOUDET, 2001) e os coeficientes de endogamia proposto por Wang (2007) para cada população foram calculados pelo programa *Coancestry* (WANG, 2011). A variação genética dentro de indivíduos, dentro e entre populações foi calculada pela análise de variância molecular (AMOVA) e o cálculo de F_{ST} global, F_{ST} par a par, heterozigidade observada (H_O) e heterozigidade esperada (H_E) foram calculados utilizando o programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). A estimativa de F_{ST} global na presença de alelos nulos foi realizada pelo método Weir (1996) com a correção descrita em Chapuis e Estoup

(2007) excluindo alelos nulos (*ENA*) utilizando o programa FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007). Para verificar se há diferença significativa entre os valores de F_{ST} estimados com e sem correção para alelos nulos utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal – Wallis a partir do programa Bioestat v. 5.0 (AYRES et al., 2007). Foi utilizado o teste de correlação de Pearson para determinar a correlação entre as distâncias genéticas e geográficas a partir do programa Bioestat v. 5.0 (AYRES et al., 2007). Para construir o dendrograma foi utilizada a distância genética de Nei (1978), empregando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages*) com valor de *bootstrap* de 1000 amostragens com o programa TFGA 1.3 (*Tools for Population Genetic Analysis*) (MILLER, 1997). As estimativas de taxa de migração foram calculadas utilizando o programa BayesAss 1.3 (WILSON; RANNALA, 2003). Para identificar o número de (K) grupos de populações geneticamente similares foi utilizado o programa *Structure* v. 2.3.3 (HUBISZ et al., 2009), para isto utilizou-se o modelo de não mistura, com um número de *burn-in* e MCMC (Markov Chain Monte Carlo) de 10.000 interações com 20 replicatas para cada K, com K variando de 1 a (número de populações + 3). O número de agrupamentos foi determinado utilizando o *website Structure Harvester* (EARL; vonHOLDT, 2012) conforme proposto por Evanno et al., 2005. Para investigar se as populações experimentaram uma redução recente do tamanho efetivo de suas populações foi utilizado o programa *Bottleneck* 2.1.02 (CORNUET; LUIKART, 1996; PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999) com o teste de sinal de Wilcoxon. Para as comparações entre indivíduos jovens e adultos foram realizadas as mesmas análises com exceção de presença de alelos nulos, coeficiente de endogamia de Wang e taxa de migrantes. Para comparar os índices de diversidade genética entre indivíduos jovens e adultos utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal – Wallis, utilizando o programa Bioestat v. 5.0 (AYRES et al., 2007).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Desenvolvimento e Caracterização dos *Primers*

Dos 109 clones sequenciados, 44 (40,37%) continham microssatélites com no mínimo quatro repetições, mas somente quatro sequências foram adequadas para o desenho dos *primers*. Dos quatro pares de *primers*

desenvolvidos, somente dois apresentaram informação polimórfica e foram descritos neste trabalho (Tabela 3.3). Os dois locos produziram um total de 17 alelos, com uma média de 8,5 alelos por loco. Os valores de PIC, de H_O (heterozigosidade observada) e H_E (Heterozigosidade esperada) estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Identificação e caracterização de dois locos de microssatélites acessados em 48 indivíduos de *Chrysophyllum gonocarpum*.

Locus	Primers (5' - 3')	K	N	H_O	H_E	PIC
Cgon122	F: GGGGATTTGGTAAAAGGTT	10	48	0,125*	0,661	0,629
	R: TTTGTAAGGCTGGCATTTC					
Cgon124	F: CGCGTGGACTAACATCAACT	7	43	0,186*	0,772	0,73
	R: GAGAGATGCTCGGGGTTTC					

K: número de alelos; N: número de indivíduos, H_O e H_E heterozigosidade observada e esperada, respectivamente; PIC: conteúdo informativo de polimorfismo. * Significativo a 5% para o teste exato para equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3.5.2 Diversidade e Estrutura Genética de Populações

Foram realizados testes de concentração de DNA com aumento de 50ng para 100ng em novas reações para genótipos que se apresentaram como homozigotos, para confirmar o resultado e testar uma concentração maior de DNA. Para os oito locos testados em *C. gonocarpum*, verificou-se um total de 129 alelos em 262 indivíduos adultos analisados em nove fragmentos amostrados (Tabela 3.4), com o número de alelos variando de 6 para o loco Cgon18 a 25 alelos para o loco Cgon122, com uma média de 16,12 alelos por loco (Tabela 3.4). Foi verificada a presença de alelos nulos em todos os locos (Tabela 3.5).

A média da riqueza alélica (A_r) foi de 6,26 alelos, no qual variou de 4,75 na população de Ibiporã a 7,15 na população da Fazenda Água Mole (Tabela 3.5). O número de alelos efetivos encontrados variou de 2,83 para a população de Ibiporã a 4,45 para a população da Fazenda Água Mole, com número médio de 3,64. A heterozigosidade observada (H_O) foi menor que a esperada (H_E) para todas as populações com valores médios de $H_O=0,26$ e $H_E=0,70$. (Tabela 3.5). Sendo assim, todas as populações não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, apresentando um déficit de heterozigotos.

Tabela 3.4 – Número de alelos encontrados em cada população de *Chrysophyllum gonocarpum* coletados em nove fragmentos distribuídos na Mata Atlântica obtidos com oito locos microssatélites.

Locos	FAM	ARA	IR	GA	DN	IBI	FW	LO	CP	Média	Total
Cgon57	6	13	5	7	5	4	7	14	16	8,56	23
Cgon12	5	6	5	7	4	5	6	6	3	5,22	16
Cgon76	10	8	10	11	9	10	10	1	1	7,78	13
Cgon52	3	4	4	1	1	1	1	5	10	3,33	14
Cgon51	9	8	9	9	8	8	6	5	3	7,22	17
Cgon122	9	10	10	8	13	8	10	10	9	9,66	25
Cgon18	5	4	4	2	4	4	3	4	3	3,66	6
Cgon124	9	6	8	10	7	5	7	7	3	6,89	15
Média										6,45	16,12

#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1.

As nove populações apresentaram valores de coeficientes de endogamia significativos, calculados conforme Wright (F_{IS}) (1965) e Wang (2007). O coeficiente de endogamia F_{IS} (WRIGHT, 1965) variou de 0,43 na população de Londrina a 0,66 em Cornélio Procópio, já o coeficiente de endogamia proposto por Wang (2007) variou de 0,55 para população de Frederico Westphalen a 0,75 para Cornélio Procópio.

O teste de equilíbrio de ligação evidenciou que diversos locos estão associados em desequilíbrio de ligação. A população de Araguari apresentou o maior desequilíbrio de ligação com nove pares de locos associados, seguida pela população da Fazenda Água Mole, que mostrou quatro pares de locos em desequilíbrio de ligação. As populações de Gália, Diamante do Norte e Ibiporã apresentaram desequilíbrio de ligação em dois pares de locos, e as demais populações, Iraí, Frederico Westphalen e Cornélio Procópio apresentaram um par de locos associados em desequilíbrio de ligação (Tabela 3.6).

Tabela 3.5 – Índices de diversidade genética de oito locos microssatélites em nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* coletadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica.

Populações	A	A _e	A _r	H _O	H _E	F _{IS}	Wang	Na
FAM	7	4,45	7,15	0,26 ^x	0,71	0,6*	0,61*	0,31
ARA	7,37	4,01	6,73	0,25 ^x	0,70	0,62*	0,62*	0,25
IR	6,87	3,64	6,45	0,23 ^x	0,64	0,59*	0,63*	0,29
GA	6,87	3,59	6,84	0,24 ^x	0,70	0,59*	0,64*	0,3
DN	6,37	3,23	5,71	0,27 ^x	0,66	0,54*	0,60*	0,26
IBI	5,62	2,83	4,75	0,27 ^x	0,62	0,45*	0,60*	0,25
FW	6,25	3,61	6,26	0,33 ^x	0,73	0,47*	0,55*	0,28
LO	6,5	3,79	5,5	0,35 ^x	0,71	0,43*	0,59*	0,18
CP	6	3,9	5,72	0,21 ^x	0,71	0,66*	0,75*	0,28
Média	6,5	3,64	6,26	0,26 ^x	0,70	0,59*	0,62*	

A: número de alelos; A_e: número de alelos efetivos; A_r: riqueza alélica; H_O: heterozigosidade observada; H_e: heterozigosidade esperada; F_{IS}: coeficiente de endogamia (Wright), Wang: Coeficiente de endogamia de Wang. Na: alelos nulos.*Coeficiente de endogamia significativo a 5% de probabilidade por população. ^xSignificativo a 5% para o teste exato para equilíbrio de Hardy-Weinberg.

#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1.

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que 86,17% da variação genética encontra-se dentro de populações, com índice de diferenciação genética interpopulacional de 13,83% (Tabela 3.7), sendo o F_{ST} de 0,138. Porém, esta maior variação genética dentro de populações está particionada em 38,09% de variação genética dentro de indivíduos e 48,08% entre indivíduos dentro de populações. Considerando a correção para exclusão de alelos nulos, o F_{ST} global estimado foi 12,19% (Tabela 3.7). Não houve diferença significativa entre o F_{ST} calculado com e sem esta correção para alelos nulos pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabela 3.6 – Presença de desequilíbrio de ligação para oito locos de microssatélites em nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* coletadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica.

Locos associados em DL*	Populações								
	FAM	ARA	IR	GA	DN	IBI	FW	CP	LO
Cgon57/Cgon12	+	+		+	+	+	+	+	
Cgon57/Cgon52		+							
Cgon57/Cgon122	+								
Cgon57/Cgon124						+			
Cgon12/Cgon76		+							
Cgon12/Cgon52	+	+							
Cgon76/Cgon52		+							
Cgon76/Cgon51	+	+							
Cgon76/Cgon18		+							
Cgon76/Cgon124			+						
Cgon52/Cgon124		+							
Cgon122/Cgon18				+					
Cgon122/Cgon124		+							
Cgon18/Cgon124					+				

p<0,05 (significância utilizando o teste exato de Fisher)

*DL: desequilíbrio de ligação.

#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1.

Tabela 3.7 – Análise de variância molecular (AMOVA) de nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* coletadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica.

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre populações	8	155,831	0,28687	13,83**
Entre indivíduos dentro de populações	253	704,427	0,99711	48,08
Dentro de indivíduos	262	207	0,79008	38,09
Total	523	1067,258	2,074	
$F_{ST} = 0,138$				
$F_{ST} \text{ (com correção para alelos nulos)} = 0,122$				

** p<0,01 Realizado com 1023 permutações.

GL – Grau de Liberdade

Os níveis de diferenciação genética interpopulacional (F_{ST}) entre as populações com exceção das populações de Londrina e Cornélio Procópio se apresentam com valores de baixo a moderado, sendo as maiores diferenças observadas entre uma destas populações (Londrina e/ou Cornélio Procópio) e as demais (Tabela 3.8). Não foi verificada correlação entre distância genética (F_{ST} par a par) e a distância geográfica (em Km).

Tabela 3.8 – Diferenciação genética aos pares com nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* coletadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica (abaixo da diagonal) e distância genética (acima da diagonal).

	FAM	ARA	IR	GA	DN	IBI	FW	LO	CP
FAM	*	650	505	320	5	200	525	185	240
ARA	0,035	*	1070	450	650	600	1100	625	560
IR	0,049	0,053	*	635	510	490	30	460	520
GA	0,042	0,047	0,020	*	325	165	665	195	125
DN	0,050	0,059	0,016	0,014	*	205	530	190	245
IBI	0,076	0,097	0,044	0,062	0,036	*	510	30	40
FW	0,047	0,066	0,039	0,049	0,038	0,068	*	490	560
LO	0,246	0,194	0,278	0,284	0,293	0,321	0,290	*	70
CP	0,244	0,190	0,275	0,288	0,296	0,331	0,304	0,042	*

Todos valores de F_{ST} foram significativos com $p < 0,05$ realizado com 1023 permutações.

#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1.

As análises da taxa de migração revelaram a presença de fluxo gênico entre as populações. Na Tabela 3.9 pode-se verificar que a população que contribuiu com maiores taxas de migrantes foi a população de Ibiporã para as populações de Iraí (27,7%), Gália (26,5%) e Diamante do Norte (29,3%) e Frederico Westphalen (28,7%). Além da população de Ibiporã, as populações de Araguari e Londrina também contribuíram com maiores taxas de migrantes para Fazenda Água Mole (28,5%) e Cornélio Procópio respectivamente (29,5%). As populações com menor taxa de migrantes foram Araguari, Ibiporã e Londrina (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 – Médias das distribuições a *posteriori* das proporções de indivíduos não-migrantes e migrantes para as nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum*. Todos os valores são significativos com intervalo de confiança de 95%.

Populações	Não migrantes	Migrantes
FAM	0,678	ARA (0,285), IR (0,004), GA (0,004), DN (0,004), IBI (0,012), FW (0,004), LO (0,004), CP (0,004)
ARA	0,927	FAM (0,003), IR (0,003), GA (0,003), DN (0,003), IBI (0,005), FW (0,003), LO (0,048), CP (0,003)
IR	0,681	FAM (0,004), ARA (0,015), GA (0,005), DN (0,004), IBI (0,277), FW (0,005), LO (0,004), CP (0,005)
GA	0,677	FAM (0,004), ARA (0,034), IR (0,004), DN (0,004), IBI (0,265), FW (0,004), LO (0,004), CP (0,004)
DN	0,677	FAM (0,004), ARA (0,006), IR (0,004), GA (0,004), IBI (0,293), FW (0,004), LO (0,004), CP (0,004)
IBI	0,989	FAM (0,001), ARA (0,001), IR (0,001), GA (0,001), DN (0,001), FW (0,001), LO (0,001), CP (0,002)
FW	0,678	FAM (0,004), ARA (0,009), IR (0,005), GA (0,004), DN (0,004), IBI (0,287), LO (0,004), CP (0,004)
LO	0,988	FAM (0,001), ARA (0,001), IR (0,001), GA (0,002), DN (0,001), IBI (0,001), FW (0,001), CP (0,002)
CP	0,673	FAM (0,004), ARA (0,004), IR (0,004), GA (0,004), DN (0,004), IBI (0,004), FW (0,004), LO (0,295)

#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1.

Quatro populações (Fazenda Água Mole, Frederico Westphalen, Londrina e Cornélio Procópio) das nove populações estudadas apresentaram efeito de deriva genética recente significativo para o modelo IAM (*Infinite Allele Model*). Sendo que as populações de Cornélio Procópio e Frederico Westphalen também apresentaram efeito de deriva genética recente significativo para o modelo de mutação TPM (*Two Phase Model*). As populações Iraí, Gália, Diamante do Norte e Ibiporã apresentaram efeito de deriva genética significativo para o modelo SMM (*Stepwise Mutation Model*) (Tabela 3.10), enquanto que a população de Araguari não apresentou efeito de deriva genética recente significativo.

Tabela 3.10 – Teste do sinal para o excesso/deficiência de heterozigotos em nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* coletadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica.

Populações	N	IAM ^a		TPM ^b		SMM ^c	
		Hd/He	P	Hd/He	P	Hd/He	P
FAM	30	1/7	0,1965*	2/6	0,1820	4/4	0,1970
ARA	30	2/6	0,1220	4/4	0,1540	5/3	0,1750
IR	30	2/6	0,3300	5/3	0,2035	6/2	0,1450*
GA	29	3/4	0,2900	4/4	0,2500	6/2	0,0640*
DN	30	2/5	0,3430	5/2	0,2430	5/2	0,1060*
IBI	31	3/4	0,2860	4/4	0,1270	5/2	0,0460*
FW	27	1/6	0,2440*	3/4	0,2400*	4/3	0,0680
LO	25	2/5	0,2980*	3/4	0,3290	6/1	0,1630
CP	30	0/7	0,0700*	1/6	0,1120*	2/5	0,1580

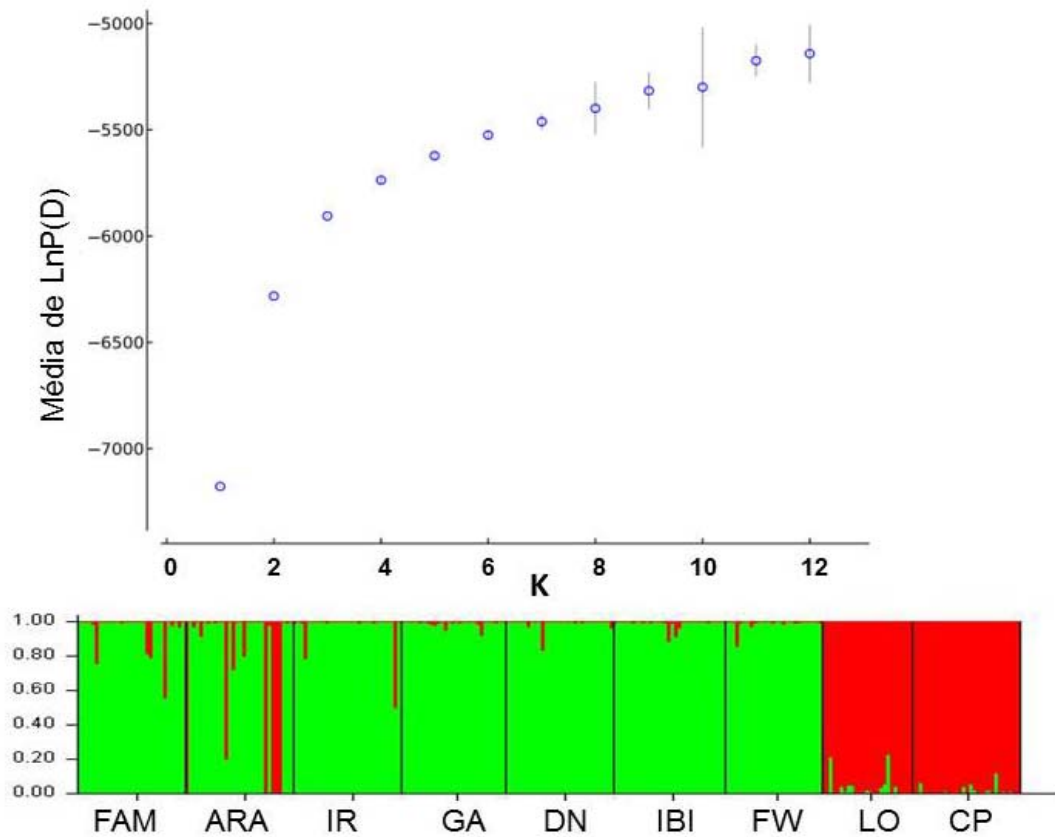
^aStepwise mutation model, ^bTwo-phase mutation model, ^cInfinite mutation model, H_d/H_e representa a relação entre o número de locos com deficiência de heterozigotos em relação aos locos com excesso de heterozigotos. A razão de H_d/H_e deve ser próxima de 1:1 para populações que não sofreram gargalo genético.

*Significância $p \leq 0,05$.

#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1.

O número de agrupamentos populacionais (K) gerados a partir da análise Bayesiana foi de K=2 grupos (Figura 3.2), conforme sugerido por Evanno et. al. (2005). A estruturação observada em dois grupos principais foi observada em um grupo representado pelas populações de Londrina e Cornélio Procópio e o outro grupo pelas demais populações.

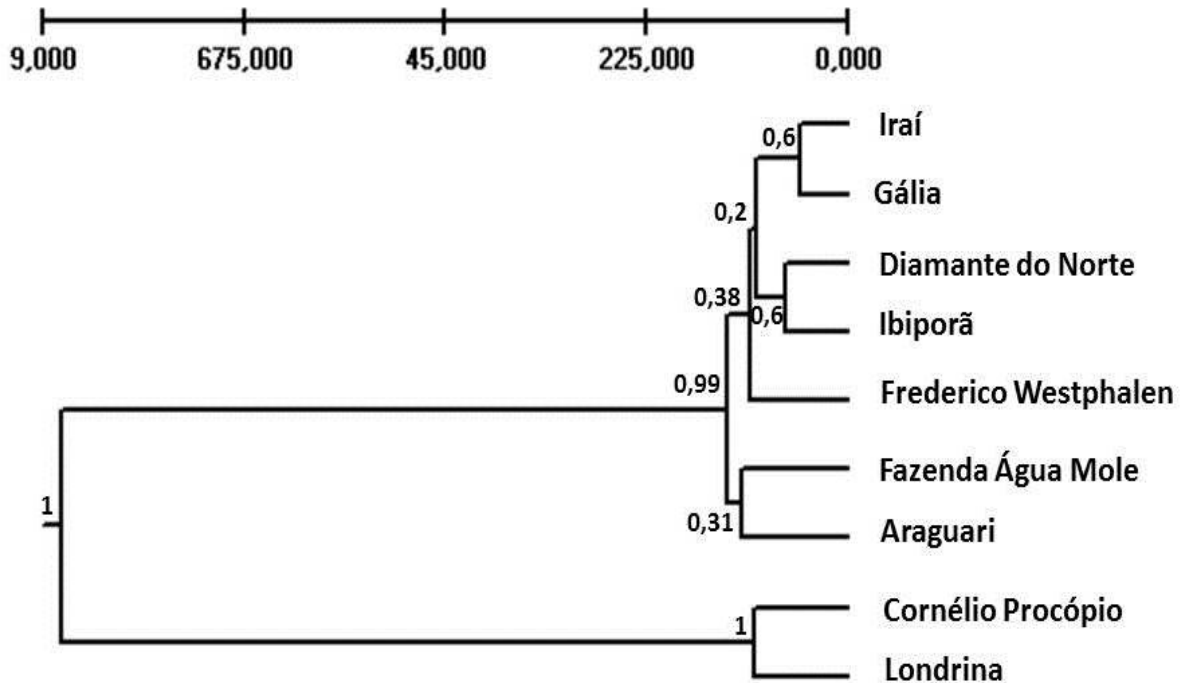
Figura 3.2 – Gráfico dos valores logarítmicos da probabilidade média posterior (LnP(D)) por agrupamentos (K) e abaixo estrutura genética de nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* distribuídos em fragmentos da Mata Atlântica inferido pela abordagem Bayesiana. O eixo y indica a porcentagem de associação estimada em cada um dos k clusters inferidos.



#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1.

A mesma estruturação observa-se no dendrograma construído a partir da distância genética de Nei (1978) e agrupado pelo método UPGMA (Figura 3.3) onde houve uma separação em dois grupos principais. Sendo um grupo representado pelas populações de Londrina e Cornélio Procópio e o outro pelas demais populações.

Figura 3.3 – Dendrograma do agrupamento de nove populações de *Chrysophyllum gonocarpum* localizadas em fragmentos distribuídos na Mata Atlântica, conforme distância genética de Nei (1978) e agrupados pelo método de UPGMA.



3.5.3 Comparação da Variabilidade Genética entre Plantas Adultas e Jovens de *C. gonocarpum*

Para os oito locos testados em indivíduos jovens e adultos de *C. gonocarpum*, verificou-se um total de 96 alelos em 113 indivíduos analisados com uma média de 12 alelos por loco. O valor médio de número de alelos por grupo variou de 5,1 para indivíduos jovens do fragmento de Cornélio Procópio a 6,5 para indivíduos adultos de Londrina. Quanto ao número de alelos efetivos, estes variaram de 3 para indivíduos jovens de Cornélio Procópio a 3,9 para indivíduos adultos do mesmo fragmento. Os valores de heterozigosidade esperada foram superiores ao de heterozigosidade observada, evidenciado também pelos elevados valores de coeficiente de endogamia positivos e significativos (Tabela 3.11). Não houve diferença significativa entre os índices de diversidade genética (A , A_e , H_e) pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Os indivíduos adultos dos dois fragmentos apresentaram efeito significativo de deriva genética recente, indicando que sofreram recentes reduções

no tamanho populacional detectada pelos dois modelos (Londrina: IAM e SMM e Cornélio Procópio: IAM e TPM). Entretanto os indivíduos jovens apresentaram efeito de deriva genética somente para um modelo (IAM) (Tabela 3.12).

Tabela 3.11 – Índices de diversidade genética em indivíduos jovens e adultos de *Chrysophyllum gonocarpum* em dois fragmentos da Mata Atlântica.

Populações	A	A _e	H _O	H _E	F _{IS}
LO adultos	6,5	3,8	0,31 ^x	0,62	0,45*
LO jovens	6	3,45	0,27 ^x	0,62	0,45*
CP adultos	6	3,9	0,19 ^x	0,62	0,51*
CP jovens	5,1	3	0,21 ^x	0,58	0,58*
Média	6	3,62	0,24 ^x	0,62	0,48*

A: número de alelos; A_e: número de alelos efetivos; H_O: heterozigidade observada; H_E: heterozigidade esperada; F_{IS}: coeficiente de endogamia.* F_{IS} significativo a 5% de probabilidade por população. ^x Significativo a 5% para o teste exato para equilíbrio de Hardy-Weinberg.

[#]Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1.

Tabela 3.12 – Teste do sinal para o excesso/deficiência de heterozigotos em quatro grupos de indivíduos jovens e adultos de *Chrysophyllum gonocarpum* em dois fragmentos da Mata Atlântica, Londrina e Cornélio Procópio.

Populações	N	IAM ^a		TPM ^b		SMM ^c	
		H _d /H _e	P	H _d /H _e	P	H _d /H _e	P
LO adultos	25	2/5	0,418*	3/4	0,595	5/2	0,101*
LO jovens	28	1/6	0,145*	2/5	0,401	5/2	0,112
CP adultos	30	0/7	0,016*	1/6	0,130*	3/4	0,587
CP jovens	30	0/7	0,021*	1/6	0,145	5/2	0,095

^aStepwise mutation model, ^bTwo-phase mutation model, ^cInfinite mutation model, H_d/H_e representa a relação entre o número de locos com deficiência de heterozigotos em relação aos locos com excesso de heterozigotos. A razão de H_d/H_e deve ser próxima de 1:1 para populações que não sofreram gargalo genético.

*Significância p ≤ 0,05.

[#]Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1

A partir da AMOVA pode-se observar que quando comparados os quatro grupos de indivíduos, representados pelos jovens e adultos nos dois fragmentos obteve-se uma variação genética de 28,98% entre estes grupos. Sendo que a maior variação genética está entre indivíduos dentro de cada grupo com 71,02% de variação (Tabela 3.13).

A partir da análise de diferenciação genética (F_{ST}) entre os pares de grupos, observa-se que os maiores valores de F_{ST} são entre adultos e jovens dentro e entre fragmentos e as menores diferenciações se encontram entre somente adultos ou entre somente jovens dos diferentes fragmentos Londrina e Cornélio Procópio (Tabela 3.14).

Tabela 3.13 – Diferenciação genética entre indivíduos adultos e jovens de *Chrysophyllum gonocarpum* em dois fragmentos da Mata Atlântica, Londrina e Cornélio Procópio.

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Componente de Variância	Porcentagem de variação
Entre os quatro grupos de indivíduos	3	80.851	0,448	28,98**
Entre todos indivíduos	109	179.83	0,550	35,57
Dentro de indivíduos	113	62	0,648	35,45
Total	225	322,681	1,548	
$F_{ST} = 0,2898$				

** $p < 0,01$ Realizado com 1023 permutações.
GL – Grau de Liberdade

Tabela 3.14 – Diferenciação genética (F_{ST}) aos pares de grupos de adultos e jovens de *Chrysophyllum gonocarpum* em dois fragmentos da Mata Atlântica, Londrina e Cornélio Procópio.

	LO adultos	LO jovens	CP adultos
LO jovens	0,392		
CP adultos	0,023	0,382	
CP jovens	0,386	0,014	0,375

Todos valores de F_{ST} foram significativos com $p < 0,05$ realizado com 1023 permutações.
#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1.

Foram encontrados alguns locos em desequilíbrio de ligação nestes grupos de indivíduos, principalmente nos indivíduos jovens, no qual o grupo que apresentou maior número de locos associados em desequilíbrio de ligação (quatro pares de locos) foi o grupo representado pelos indivíduos jovens de Londrina.

Aquele que não apresentou nenhum par de locos associados em desequilíbrio de ligação foi o grupo dos indivíduos adultos de Londrina (Tabela 3.15).

Tabela 3.15 – Presença de desequilíbrio de ligação para oito locos de microssatélites em indivíduos jovens e adultos de *Chrysophyllum gonocarpum* em dois fragmentos da Mata Atlântica, Londrina e Cornélio Procópio.

Locos associados	Populações			
	LO adultos	LO jovens	CP adultos	CP jovens
Cgon57/Cgon12		+	+	+
Cgon57/Cgon124		+		
Cgon76/Cgon51		+		
Cgon122/Cgon124		+		+

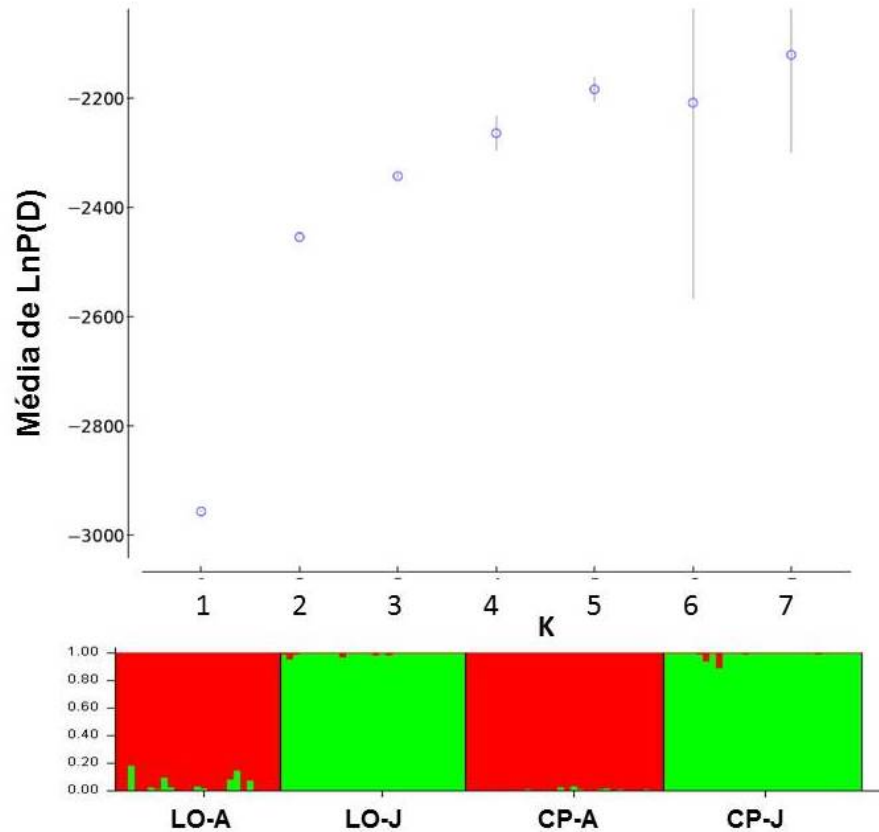
$p \leq 0,05$ Significância utilizando o Teste Exato de Fisher.

#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1.

O número de agrupamentos (K) gerados a partir da análise Bayesiana foi de K=2 (Figura 3.4), conforme sugerido por Evanno et al. (2005). A estruturação foi observada em dois grupos principais, sendo um grupo representado pelos indivíduos adultos e o outro grupo pelos indivíduos jovens.

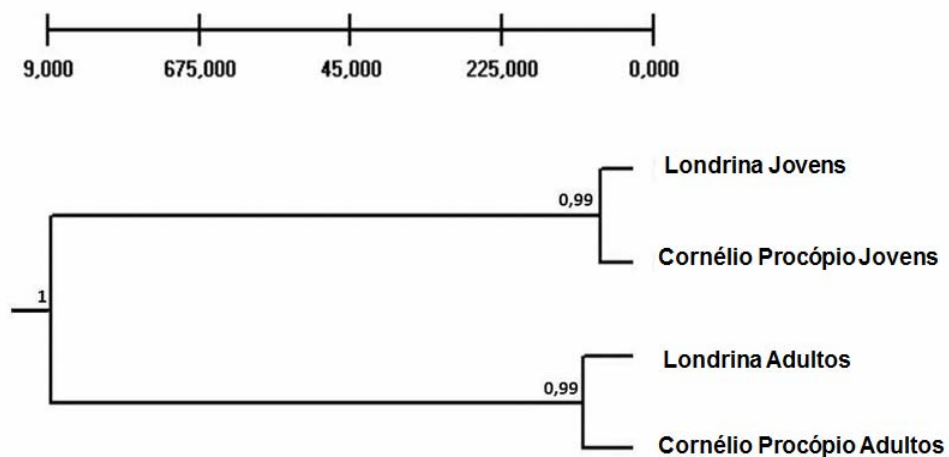
O dendrograma realizado com base na distância genética de Nei também mostrou a formação de dois grupos principais, assim como a análise bayesiana, com um grupo representado pelos indivíduos jovens e outro pelos adultos (Figura 3.5).

Figura 3.4 – Gráfico dos valores logarítmicos da probabilidade média posterior (LnP(D)) por agrupamentos (K) e abaixo estrutura genética evidenciada para as diferentes grupos de indivíduos adultos e jovens de *Chrysophyllum gonocarpum* em dois fragmentos da Mata Atlântica, Londrina e Cornélio Procópio.



#Os nomes dos municípios correspondentes às siglas estão especificados na Tabela 3.1.

Figura 3.5 – Dendrograma do agrupamento entre adultos e jovens de *Chrysophyllum gonocarpum* em dois fragmentos da Mata Atlântica, conforme distância genética de Nei (1978) e agrupados pelo método de UPGMA.



3.6 DISCUSSÃO

3.6.1 Diversidade Genética em *Chrysophyllum gonocarpum*

Chrysophyllum gonocarpum apresentou níveis médios de diversidade genética em nove fragmentos distribuídos no bioma da Mata Atlântica, em termos de número de alelos médio por loco por população. Valores semelhantes foram encontrados em outras duas espécies que também ocorrem na Mata Atlântica *Luehea divaricata*, $A = 5$ (CONSON et al., 2013) e *Parapiptadenia rigida*, $A = 6,1$ (MIRANDA, 2014). Estes valores encontrados em *C. gonocarpum* foram menores do que encontrado em duas espécies pertencentes ao bioma do Cerrado *Caryocar braziliense* ($A = 10,6$; COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001) e *Hymenaea stigonocarpa* ($A = 11,7$; MORAES; KAGEYAMA; SEBBENN, 2007). Entretanto os valores das espécies no bioma da Floresta Amazônica, *Theobroma cacao*, $A = 4$ (MOTAMAYOR et al., 2002) e *Swietenia macrophylla*, $A = 7,3$ (NOVICK et al., 2003) foram semelhantes aos valores encontrados em *C. gonocarpum*.

Em *C. gonocarpum* foi encontrada uma heterozigosidade média observada ($H_o = 0,26$) menor em relação à heterozigosidade média esperada ($H_E = 0,7$) (Tabela 3.5), evidenciado pelos elevados valores de coeficiente de endogamia ($F_{IS} = 0,59$ e $Wang = 0,62$) positivos e significativos. A baixa heterozigosidade observada em algumas espécies de árvores tropicais pode ser resultado do sistema de reprodução com aumento da endogamia biparental, autofecundação devido a dispersão de pólen limitada, estrutura genética espacial (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001), alelos nulos ou redução do tamanho populacional efetivo e consequente perda de diversidade.

Quanto aos alelos nulos foram observados em todos os locos de microsatélites em *C. gonocarpum* (Tabela 3.5). A presença de alelos nulos é devido principalmente a mutações nos sítios de anelamento dos iniciadores (*primers*) que impedem a amplificação de um dos alelos (DEWOODY; NASON; HIPKINS, 2006). Nos locos onde ocorrem, os alelos nulos podem levar a uma redução da heterozigosidade observada em relação à heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e, portanto um excesso de homozigotos. Entretanto, a redução de heterozigosidade observada não pode ser distinguida da redução indicativa de endogamia quando as populações não estão no EHW (van

OOSTERHOUT et al., 2004). Uma indicação de que o desvio em relação ao EHW se deve a eventos demográficos ou a características reprodutivas e não à presença de alelos nulos é que os alelos nulos tendem a afetar apenas alguns locos, enquanto que a endogamia leva a um excesso de homozigotos em todos os locos (DEWOODY; NASON; HIPKINS, 2006). Desta maneira, é mais provável que este excesso de homozigotos encontrados nestas populações seja resultado de cruzamentos endogâmicos e não pela presença de alelos nulos pois, não houve diferença significativa entre os valores de F_{ST} global (0,122) com correção para alelos nulos e o valor de F_{ST} (0,1383) estimado sem esta correção (Tabela 3.7).

Diante dos resultados, é provável que estas populações de *C. gonocarpum* vêm sofrendo um intenso processo de endogamia, resultante da redução do tamanho efetivo de suas populações, devido ao processo de fragmentação que ocorreu nos últimos 80 anos. Assim, os valores do coeficiente de endogamia associados à menor heterozigosidade observada, indica uma possível perda da diversidade genética por meio de depressão endogâmica. Uma vez que, o aumento do endocruzamento é um dos principais fatores deletérios decorrente da degradação do habitat conforme Lowe et al. (2005). Sendo assim o processo de fragmentação e consequente redução das populações e isolamento podem ser considerados fatores importantes que contribuíram com a diminuição do nível de heterozigosidade em *C. gonocarpum*. Conson et al. (2013) encontraram no estudo de nove populações de *Luehea divaricata* valores de F_{IS} variando de -0,01 até 0,40 e Miranda (2014) em um estudo em 14 populações de *Parapiptadenia rigida* verificou que os valores de F_{IS} variaram de 0,22 a 0,65. No presente estudo encontramos para *C. gonocarpum* valores de F_{IS} que variaram de 0,43 a 0,66, os quais são maiores que os encontrados nas duas espécies citadas anteriormente.

O baixo polimorfismo e elevado índice de endogamia encontrado em *C. gonocarpum* pode ser intensificado devido a uma dispersão restrita de pólen e semente, pois fatores ecológicos como distribuição espacial da população, densidade de florescimento podem afetar o comportamento de forrageamento de polinizadores, interferindo na distância da dispersão de pólen (COLLEVATTI et al., 2011). *Chrysophyllum gonocarpum* é polinizada principalmente por abelhas e formigas (FELIPPI et al., 2008) e possui uma floração abundante e sincronizada (BIANCHINI, PIMENTA; SANTOS, 2006). Desta maneira, alta sincronia e o florescimento de plantas vizinhas podem reduzir a distância de dispersão do pólen

devido à alta proporção de polinizadores entre as plantas vizinhas, enquanto que a não sincronia pode resultar em distâncias maiores de dispersão de pólen (AUGSPURGER, 1980; WHITE; BOSHIER, 2000). Além disso, *C. gonocarpum* apresenta uma dispersão de sementes mediada por pequenos animais (mamífero, mirimeco e ornitocórica, FELIPPI et al., 2008) que comparado a dispersão pelo vento (*L. divaricata* e *P. rigida*) atinge menores distâncias de dispersão. Estes fatos podem contribuir com os elevados valores de endogamia encontrados em *C. gonocarpum* em relação às espécies citadas anteriormente. Estes resultados podem ser confirmados pelo desequilíbrio de ligação (Tabela 3.6) que de acordo com Futuyma, (2005) é resultante direto dos elevados níveis de F_{IS} (Tabela 3.5), os quais são responsáveis pela manutenção dos mesmos.

A fragmentação nas nove populações estudadas levou a um efeito recente de deriva genética em oito delas (Tabela 3.10). Duas populações apresentaram efeito recente de gargalo genético, verificado tanto pelo modelo IAM quanto pelo modelo TPM (Cornélio Procópio e Frederico Westphalen). Já as populações Fazenda Água Mole e Londrina mostraram efeito da ação da deriva genética recente somente pelo modelo IAM, enquanto as populações (Iraí, Gália, Diamante do Norte e Ibiporã) mostraram o efeito recente de deriva genética somente pelo modelo SMM. A população de Araguari não mostrou efeito de deriva genética recente, embora esta população tenha um efeito elevado de F_{IS} e desequilíbrio de ligação.

O efeito de deriva genética em *C. gonocarpum* foi menos intenso quando comparado com os resultados de *L. divaricata* (CONSON et al., 2013) pelo fato da redução do tamanho efetivo de populações em *L. divaricata* ocorreu não somente devido a fragmentação, mas também pelo corte seletivo. Resultados semelhantes ao encontrado em *C. gonocarpum* foi demonstrado por Miranda (2014) em *P. rigida*, no qual apenas uma população apresentou efeito de deriva genética recente evidenciada pelos três modelos (IAM, TPM e SMM), duas populações mostraram efeito de deriva genética pelos modelos (TPM e SMM) e nove populações por somente um modelo (SMM) e duas populações não apresentaram efeito de deriva genética recente. Conforme Young, Boyle e Brown (1996) e Lowe et al. (2005), as mudanças populacionais associadas a degradação de habitat levam a uma erosão da diversidade genética e aumento da divergência genética entre

populações, devido ao aumento da deriva genética e taxa de endocruzamento, fato claramente demonstrado nas populações estudadas de *C. gonocarpum*.

Considerando os valores médios de alelos por locos (6,5 Tabela 3.5) encontrados em *C. gonocarpum*, pode-se considerar que estas populações ainda apresentam uma diversidade genética moderada. De acordo com Lowe et al. (2005) o efeito do endocruzamento é observado imediatamente após a redução do tamanho populacional, entretanto a queda da diversidade genética (número de alelos e alelos efetivos) ocorre de maneira lenta nas próximas gerações. Porém, mesmo quando estudos de marcadores moleculares neutros, como microssatélites, indicam a presença substancial de variabilidade genética, a diversidade genética para locos importantes para sobrevivência da espécie ao longo do tempo podem estar em declínio.

3.6.2 Estrutura Genética de Populações em *Chrysophyllum gonocarpum*

Embora as populações de *C. gonocarpum* tenham apresentado valores elevados de coeficiente de endogamia (F_{IS} e Wang) (Tabela 3.5), a análise de variância molecular (AMOVA, Tabela 3.7) mostrou que 38,09% da variação está dentro de indivíduos, 48,08% está entre indivíduos dentro de populações e 13,83% está entre populações. O valor de F_{ST} (13,83%) indica uma diferenciação genética moderada entre populações como descrito por Hartl e Clark (2007). Esta distribuição da variação genética maior dentro de populações é característica de uma espécie arbórea alógama (HAMRICK; GODT, 1989). Segundo Bianchini et al. (2006) e Felippi et al. (2008) ocorre sincronia durante a floração de *C. gonocarpum* associado a visita de suas flores por pequenos insetos (FELIPPI et al., 2008) fato que confirma que esta espécie possua um modo de reprodução predominantemente por alogamia.

Não foi encontrada uma correlação positiva entre os valores de F_{ST} entre pares de populações e distâncias geográficas. Populações com grandes distâncias geográficas (Araguari e Frederico Westphalen), não apresentaram uma grande distancia genética entre elas. Por sua vez, a menor distância genética se encontra entre as populações de Gália e Diamante do Norte, que se situam a 435 km de distância (Tabela 3.8). As menores distâncias genéticas entre os pares das demais populações são confirmadas pelos valores de estimativa de fluxo gênico recente entre essas populações, visto que estas apresentam grande quantidade de

migrantes entre elas (Tabela 3.9). Como mostra análise bayesiana para determinação do número de migrantes com exceção das populações de Londrina, Araguari e Ibiporã, todas as outras populações compartilham de uma taxa de migrantes em torno de 30%, mostrando que estas populações não estão ainda geneticamente isoladas das outras populações, fator que mantém ainda um nível relativo de variabilidade genética.

As populações de Londrina e Cornélio Procópio se mostraram isoladas das demais, apresentando os maiores valores de distância genética em relação a outras populações. Os valores de F_{ST} (Tabela 3.8) entre pares de populações indicam que estas populações devido à fragmentação de habitat têm sofrido efeitos de deriva genética e depressão endogâmica, pois segundo Lowe et al. (2005) a fragmentação de habitat aumenta o isolamento entre os fragmentos e reduz o fluxo gênico. Isto pode ser observado nestas populações a partir das baixas proporções de migrantes (Tabela 3.9), compartilhados principalmente entre estas populações, combinado com resultados significativos para deriva genética recente e elevada diferenciação entre indivíduos jovens e adultos dentro destes fragmentos (Tabela 3.14, Figuras 3.4 e 3.5).

O dendrograma construído a partir de dados de distância genética de Nei (1978) e gerado pelo método de agrupamento UPGMA separou as populações em dois grupos principais (Figura 3.3). Neste agrupamento o que se pode observar é o isolamento das populações de Londrina e Cornélio Procópio em relação às demais. Este resultado foi corroborado pela análise Bayesiana para um número K de grupos, o qual mostrou a existência de dois grupos (Figura 3.2). Sendo um deles constituído pelas populações de Londrina e Cornélio Procópio, mostrando que essas populações são mais semelhantes geneticamente. As demais populações estão agrupadas em um único grupo, não apresentando fortes estruturas, embora haja uma diferenciação genética entre populações moderada (13,83%), elevados coeficientes de endogamia e gargalos genéticos.

Segundo Young, Boyle e Brown (1996) as mudanças populacionais associadas com a degradação do habitat levam a uma erosão da diversidade genética, como o observado em *C. gonocarpum*, com divergência interpopulacional moderada, devido ao aumento da deriva genética, taxa elevada de endocruzamento e redução do fluxo gênico. Essas mudanças afetam a viabilidade das populações a curto e em longo prazo. A curto prazo, nas populações, pode ocorrer o aumento da

susceptibilidade a doenças e pestes e fixação de alelos deletérios (BARRET; KOHN, 1991; ISAGI et al., 2007). Em longo prazo a perda da diversidade genética deve reduzir a capacidade das populações a responderem as mudanças das pressões seletivas (FUTUYMA, 2005).

3.6.3 Comparação Entre Indivíduos Adultos e Jovens de *Chrysophyllum gonocarpum*

Foi observado em todos os grupos tanto de adultos quanto jovens que não houve diferenças significativas entre os índices de diversidade genética encontrados nos dois fragmentos (Londrina e Cornélio Procópio) em *C. gonocarpum* (Tabela 3.11), pelo teste de Kruskal-Wallis. Porém, os resultados da análise de variância molecular mostraram uma porcentagem de variação entre grupos de 28,98% com o F_{ST} de 0,1957 (Tabela 3.13).

Esta alta diferenciação entre as amostras é confirmada pela análise bayesiana de agrupamentos que separou os indivíduos jovens dos adultos em ambos os fragmentos. Resultado este que foi corroborado pelo dendrograma construído pela Distância Genética de Nei (1978), evidenciado pelos elevados valores de diferenciação (F_{ST} par a par, Tabela 3.14) encontrados entre os indivíduos adultos e jovens dentro do mesmo fragmento e entre fragmentos diferentes. Análises realizadas nestes mesmos grupos de indivíduos jovens e adultos nestes fragmentos com marcadores AFLP “*Amplified Fragment length polymorphism*” (dados não publicados) mostraram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho com marcadores SSR com valores de diversidade genética moderados e elevada diferenciação genética entre indivíduos jovens e adultos.

Além disso, foi observado nas quatro amostras tanto de adultos quanto de jovens em ambos fragmentos o efeito de deriva genética recente, com maior intensidade nos indivíduos adultos, no qual foram significativos para análise a partir de dois modelos para Londrina (IAM e SMM) e para Cornélio Procópio (IAM e TPM) (Tabela 3.12). Já as amostras de indivíduos jovens de ambos fragmentos também mostraram um efeito de deriva genética recente, porém a partir de um único modelo (IAM). Estes dados mostram a ocorrência de deriva genética recente nestes

grupos, o que é confirmado pela ocorrência de desequilíbrio de ligação tanto nos indivíduos adultos quanto nos indivíduos jovens (Tabela 3.15).

Apesar do efeito de gargalo genético recente não ter sido tão severo nos indivíduos jovens (Tabela 3.12) quanto nos adultos, os indivíduos jovens apresentaram maior número de pares de locos em desequilíbrio de ligação, sendo observado um maior número no grupo de indivíduos jovens do fragmento de Londrina (Tabela 3.15).

Considerando ainda o número de locos em desequilíbrio de ligação, presume-se que os indivíduos jovens têm sofrido maiores consequências na distribuição de sua diversidade, devido ao aumento destes nos indivíduos jovens, pois a deriva genética pode levar a alterações nas frequências alélicas e desta maneira causar uma grande divergência genética entre as gerações (CARVALHO; OLIVEIRA, 2004). Consequentemente a alta divergência encontrada entre as gerações de *C. gonocarpum* indica que a deriva genética afetou a estrutura genética destes grupos de plantas adultos e jovens e quanto aos efeitos na redução da diversidade genética, estes possivelmente aparecerão nas próximas gerações. Uma vez que primeiramente é observada a endogamia imediatamente após a redução do tamanho populacional, já a queda da diversidade genética ocorre de maneira lenta nas gerações seguintes (LOWE et al., 2005).

Portanto esta diferenciação genética revelada entre jovens e adultos pode ser explicada pelas elevadas taxas de endocruzamento, como também pelo efeito de deriva genética que aconteceram nas gerações que antecedem os indivíduos adultos e jovens.

4 CONCLUSÃO

Chrysophyllum gonocarpum mostrou níveis moderados de diversidade genética nas populações analisadas. Foi encontrada uma maior variação genética dentro de populações do que entre populações condizente com a distribuição da variação genética encontrada em espécies alógamas. A manutenção a longo prazo da diversidade genética nesta espécie está comprometida devido aos efeitos da endogamia e gargalo genético, confirmados pela ocorrência de muitos locos em desequilíbrio de ligação tanto nos indivíduos adultos quanto nos jovens. Sendo assim, estratégias de conservação devem ser adotadas. Devido à moderada diferenciação entre populações, com a maior parte da variabilidade localizada dentro de indivíduos e entre indivíduos dentro de população planos de conservação *in situ* deve priorizar a proteção de populações com maior número de indivíduos. Além disso, embora a redução da diversidade genética não seja significativa entre gerações a alteração da estrutura genética é visível, e associada a pares de locos em desequilíbrio de ligação confirma que estas populações tem experimentado perda de diversidade genética por deriva genética e endogamia.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado e PDSE – Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Fundação Araucária pelo suporte financeiro. Queremos também agradecer ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo pela licença para a coleta na Estação Ecológica dos Caetetus e ao Instituto Ambiental do Paraná pela licença para a coleta no Parque Estadual Mata dos Godoy e Parque Estadual Mata São Francisco.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signal in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 5177–5188, 2008.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the Genetics of Populations**. Blackwell. 2007. 642p.
- ALVES, R. M.; ARTERO, A. S.; SEBBENN, A. M.; CLEMENT, C.; FIGUEIRA, A. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu, *Theobroma grandiflorum*. **Tree Genetics & Genomes**, St. Louis, v. 3, p. 289-298, 2007.
- ANJOS, L. Consequências biológicas da fragmentação no norte do Paraná. **SÉRIE TÉCNICA IPEF**, v. 12, n. 32, p. 87-94, dez. 1998.
- AUGSPURGER, C. K. Mass-flowering of a tropical shrub (*Hybanthus prunifolius*): influence on pollinator attraction and movement. **Evolution**, v. 34, p. 475–488. 1980.
- AYRES, M.; AYRES, Jr.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S.; BioEstat. Versão 5.0, **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, Belém: Pará, Brasi, 2007.
- AZEVEDO, V. C. R. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae**. 2007. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- BARBOSA, O. et al. Identificação e fenologia de espécies arbóreas da Serra da Cantareira. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.11, p.1-168, 1977.
- BARRETT, S. C. H.; KOHN, J. R. Genetic an evolutionary consequence as small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. **Genetics and conservation of rare plants**. New York: Oxford Univ. Press, 1991. p.3-30.
- BAWA, K. S. Breeding systemas of tree species of a lowland torpical community. **Evolution**, Wiley, USA, v. 28, n. 1, p. 85-92, fev. 1974.
- BIANCHINI, E.; GARCIA, C. C.; PIMENTA, J. A.; TOREZAN, J. M. D. Slope variation and population structure of tree species from different ecological groups in South Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 3, p. 643-652. 2010.
- BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; SANTOS, F. A. M. DOS. Fenologia de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. (Sapotaceae) em floresta semidecídua do Sul do Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v. 29, n. 4, p. 595-602, 2006.

- BIANCHINI, E.; POPOLO, R. S.; DIAS M. C.; PIMENTA, J. A. Diversidade e estrutura de espécies arbóreas em área alagável do município de Londrina, sul do Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 17, n. 3, p. 405-419. 2003.
- BILLOTTE, N. et al. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**. Paris, v. 54, n. 4, p. 277–288, 1999.
- BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. Pollen movement in a continuous forest of *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 9, p. 855-868, ago. 2008.
- CARNAVAL, A.C.; KICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C.; Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot, **Science**, v. 323, p. 785-789, 2009.
- CARVALHO, D.; OLIVEIRA, A. F. de Genetic structure of *Copaifera langsdorffii* Desf. natural populations. **Cerne**, v. 10, p. 137-153. 2004.
- CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J.J.; FUCHS, E.A. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conserv. Biol.**, v. 16, p. 137–147. 2002.
- CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 621-631. 2007.
- CHATTERJI, S.; PACHTER, L. Reference based annotation with GeneMapper.. **Genome Biology**, v. 7, n. 4, p. R29.1 - R29.10. 2006.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v.23, n. 1, p. 72-84, mar. 1969.
- COLE, T. C. Genetic variation in rare and common plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Chicago, v. 34, p. 213-237, nov. 2003.
- COLLEVATTI, R. G.; BRAGA, A. C. Temporal variation in pollen dispersal and breeding structure in a bee-pollinated Neotropical tree. **Heredity**, v. 106, p. 911–919. 2011.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Mol. Ecol.**, v. 10, p. 349–356. 2001.
- CONSON, A. R. O.; RUAS, E. A.; VIEIRA, B. G.; RODRIGUES, L. A.; COSTA, B. F.; BIANCHINI, PRIOLI, A. J.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). **Genetica**, v. 141, p. 205–215. 2013.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Rockville Pike, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, dez. 1996.

- DEMPSTER, A. P.; LAIRD, N.; RUBIN, D. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 39, p. 1-38. 1977.
- DEWOODY, J.; NASON, J. D.; HIPKINS, V. D. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 951-957. 2006.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, [S.l.] v.19, n.11-15, 1987.
- EPPERSON, B. K.; TIAN-QUAN LI. Gene dispersal and spatial genetic structure. **Evolution**, Michigan, v.51, n. 3, p. 672-681, jun 1997.
- EARL, D.A.; von HOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources** v. 4, p.359–361. 2011.
- EDWARDS, K.J.; BARKER, J.H.; DALY, A.; JONES, C.; KARP, A. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. **Biotechniques**, v. 20, p. 758–760. 1996.
- EPPERSON, B. K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. [s. n.], Sunderland: Sinauer, 1990. p. 229-253.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**. v. 14, p.2611– 2620. 2005.
- EXCOFFIER, L. G.; LAVAL, A. S.; SCHNEIDER. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**. 2005. v.1, p. 47-50.
- FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Longman: Harlow, 1996. 480 p.
- FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v.34, p. 487-515, nov. 2003.
- FELIPPI, M.; GROSSI, F.; NOGUEIRA, A. C.; KUNIYOSHI, Y. S. Fenologia e germinação de sementes de Aguai, *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichl.) Engl. **FLORESTA**, Curitiba, PR, v. 38, n. 2, abr./jun. 2008.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FINGER, A.; KETTLE, C.J; KAISER-BUNBURY, C. N.; VALENTIN, T.; MOUGAL, J.; GHAZOUL, J. Forest fragmentation genetics in a formerly widespread island endemic tree: *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae). **Molecular Ecology**. v. 21, p. 2369–2382. 2012.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **C. R. Biologies** 326, p. S22–S29. 2003.

FUTUYMA, D.J.; **Evolution**, Sinauer Associates, Inc, Sunderland, p.603, 2005.

GHAZOUL, J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. **Biol. Rev.**, v. 80, p. 413–443. 2005.

GIULIETTI, A. M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M. J. G.; QUEIROZ, L. P.; SILVA, J. M. C. Plantas raras do Brasil. **Conservação Internacional**, Belo Horizonte. 492 p. 2009.

GONZALES, E.; HAMRICK, J. L. Distribution of genetic diversity among disjunct populations of the rare forest understory herb, *Trillium reliquum*. **Heredity**, v. 95, n. 4, p. 306-314, oct. 2005.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversity and fixation indices, version 2.9.3.2. 2001. Disponível em:
<<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Acesso 03 Nov 2014.

GUO, S.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics** v. 48, p. 361–372. 1992.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, et al., (Eds). Genetics and wild population management. New York: **Addison-Wesley**, p. 500-508. 1983.

HAMRICK, J.L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir [eds.], Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer, Sunderland. 1989. p.43–63

HAMRICK, J. L. Genetic diversity and conservation in tropical forests. Proc. International Symposium on Genetic conservation and Production of Tropical forest Tree Seed. Asean-Canada. In: DRYSDALE, R. M.; JOHN, S. E. T.; YOPA, A. C. **Forest Tree Centre**. [S. I.], 1994. p. 1-9.

HANSON, T. R.; BRUNSFELD, S. J.; FINEGAN, B.; WAITS, L. P. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 2060-2073, 2008.

HARDESTY, B. D.; DICK, C. W.; HAMRICK, J. L.; DEGEN, B.; HUBBELL, S. P.; BERMINGHAM, E. Geographic Influence on Genetic Structure in the Widespread Neotropical Tree *Simarouba amara* (Simaroubaceae). **Tropical Plant Biology** v. 3, p. 28–39. 2010.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**. Sinauer Associates, Inc. 4. ed. 2007. 565p.

HEDRICK, P.W. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, Lawrence, v.53, n.2, p. 313-318, 1999.

- HNIA, C.; MOHAMED, B. Genetic diversity of *Lavandula multifida* L. (Lamiaceae) in Tunisia: implication for conservation. Blackwell Publishing Ltd, **Afr. J. Ecol.**, v. 49, p. 10–20. 2010.
- HUBISZ, J. M.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Mol Ecol Resour**, v. 9, p. 1322–1332. 2009.
- ISAGI, Y.; SAITO, D.; KAWAGUCHI, H.; TATENO, R.; WATANABE, S. Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of an *Aesculus turbinata* populations. **Journal of Ecology**, v. 95, p. 983-990. 2007.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant Systematics – A Phylogenetic Approach**. 3. ed. USA – Sunderland: Sinauer Associates, 1999. 464 p.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. Série Técnica IPEF, v.12, n.32, p.65-70, dez. 1998.
- KAGEYAMA, P.Y. et al. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 64, n. 64, p. 93-107, dez. 2003.
- KARRON, J. D.; THUMSER, N. N.; TUCKER, R.; HESSENAUER, A. J. The influence of population density on outcrossing rates in *Mimulus ringens*. **Heredity**, v. 75, p. 175-180, nov. 1995.
- KEVIN, K.; NG, S.; LEE, L.; KOH, L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular ecology**, v. 13, n. 5, p. 657-669, mar. 2004.
- KUERA, N. Y. M. et al. **Arboles Comunes Del Paraguay**. 2ª ed. Paraguay: Cuerpo de Paz, Colección e Intercambio de Información, 2002. 458 p.
- LEE, S. L. et al. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virginin Jungle reserves in Peninsular Malaysia. **American Journal of Botany**, [S.l.], v. 89, n. 3, p. 447-459, mar. 2002.
- LIMA, L, F. **Efeito de Borda Sobre a Assembleia de Plantas Herbáceas em um Fragmento de Florestas Atlântica, Alagoas, Brasil**. 93 f. Dissertação Mestrado (Mestrado em Botânica) – Pró Reitoria de Pós-Graduação Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 2 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 384 p.
- LOWE, A.J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C.F.E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v. 95, p. 255–273. 2005.

- LUNA R.; EPPERSON, B. K.; OYWAMA, K. Spatial genetic structure of two sympatric neotropical palms with contrasting life histories. **Heredity**, [S.l.], v. 95, n. 4, p. 298-305, oct. 2005.
- MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das Angiospermas - das Bixáceas às Rosáceas**. Santa Maria: Editora UFSM, 2000. 240 p.
- MARQUARDT, P. E.; EPPERSON, B. K. Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. **Molecular Ecology**, [S.l.], v. 13, n. 11, p. 3305-3315, nov. 2004.
- MARSHALL, T. C. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**. [S.l.], v.7, n. 5, p. 639-655, May. 1998.
- MARTINS, K.; RIBAS, L. A.; MORENO, M. A.; WADT, L. H. O. Consequências genéticas da regeneração natural de espécies arbóreas em área antrópica, AC. Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 897-904, 2008.
- MELO JÚNIOR, A. F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J. S.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, n. 66, p. 56-65, 2004.
- MENGES, E. S. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. **Conservation Biology**, [S.l.] v. 5, n. 2, p. 158-164, jun. 1991.
- MILLER, M. (1997) **Tools for population genetic analyses** (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Department of Fisheries and Wildlife. Disponível em: <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>. Acesso: 04 Jan 2014
- MILLIGAN, B. G.; LEEBENS-MACK, J.; STRAND, A. E. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. **Molecular Ecology**, [S.l.] v.3, n. 4, p. 423-435, aug. 1994.
- MIRANDA, B. F. D. O. A. de Diversidade genética em populações de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fabaceae-Mimosoideae) por marcadores microssatélites. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, 2014.
- MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em pequenas populações fragmentadas e em árvores isoladas de *Hymenaea stigonocarpa*. **Scientia forestalis**, n. 74, p. 75-86, junho 2007.
- MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R.; VENCOSKY, R. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 237-248, out. 1999.
- MOREIRA, P. A.; FERNANDES, G. W.; COLLEVATTI, R. G. Fragmentation and spatial genetic structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. **Forest Ecology and Management**, v. 258, p. 2690–2695. 2009.

- MOTAMAYOR, J. C.; RISTERUCCI, A.M., LOPEZ, P. A.; LANAUD, C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, v. 89, p. 380–386. 2002.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, [S.l.], v. 55, n. 2, p. 335-350. 1987.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J.; Biodiversity hotspots for conservation priorities, **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S.l.], v.70, n.12, p.3321-3323, dez. 1973.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. **Genetics**, [S.l.] v. 89, n. 3, p. 583-590, jul. 1978.
- NEIGEL, J.E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematics**, Palo Alto, v. 28, p. 105-128, 1997.
- NOVICK, R. R.; DICK, C. W.; LEMES, M. R.; NAVARRO, C., CACCONE, A.; BERMINGHAM, E. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, v.12, p. 2885–2893. 2003.
- PARKER, P. G.; SNOW, A. A.;SCHUG, M. D.; BOOTON, G. C.; FUERST, P. A. What molecules can tell us about populations: choosing and using molecular markers. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 361-382, 1998.
- PENNINGTON, T. D. Sapotaceae (Sapodilla family). In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W. M. & HEALD, S. V. **Flowering plants of the Neotropics**. Princeton: University Press, 2004. p. 342-344.
- PETERS, M.B.; HAGEN C.; TRAPNELL, D.W.; HAMRICK, J.L.; ROCHA, O.; SMOUSE, P.E.; GLENN T.C. Isolation and characterization of microsatellite loci in the guanacaste tree, *Enterolobium cyclocarpum*. **Mol. Ecol. Res.**, v. 8, p. 129-131, 2008.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**. [S.l.], v. 90, n. 4, p. 502-503, 1999.
- PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina, E. Rodrigues, 2001. 328p
- QUESADA, M.; STONER, K.E.; LOBO, J.A.; HERRERIAS-DIEGO, Y. Effects of forest fragmentation on pollinator activity and consequences for plant reproductive success and mating patterns in bat-pollinated Bombacaceous trees. **Biotropica**, v. 36, p. 131–138. 2004.

- RAJORA, O. P.; RAHMAN, M. H.; BUCHERT, G. P.; DANCİK, B. P. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern White pine (*Pinus strobes*) in Ontario, Canada. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 339-348. 2000.
- RAMÍREZ, H.; CALDERON, A.; ROCCA, W. **Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal**. In: Rocca W & Mroginski L (Ed.) Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y plicaciones. Cali, CIAT. p.825-856. 1991.
- RANTA, P.; BLOM, T.; NIEMELA, J.; JOENSUU, E.; SIITONEN, M. The fragmented Atlantic Rainforest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. **Biodivers Conserv.**, v. 7, p. 385–403. 1998.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, [S.I.], v. 86, n. 3, p. 248-249, 1995.
- REED, D. H. Relationship between population size and fitness. **Conservation Biology**, Oxford, v.19, p. 563-568, 2005.
- REITZ, P. R. **Sapotaceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1968. 72 p.
- RODRIGUES, L. A.; RUAS, E. A.; SIGNORI, N. C.; COSTA, B. F.; FARIAS-MISSAO, D. C. L.; VIEIRA, B. G.; CONSON, A. R. O.; CHAVES, C. L.; DELFINI, J.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M. Isolation and characterization of 8 microsatellite loci from *Chrysophyllum gonocarpum* (Sapotaceae). **Genetics and Molecular Research**, v.12, n, 1, p. 416-419. 2013.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: MISENER, S.; KRAWETZ, S. A. **Bioinformatics Methods and Protocols**. Eds. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000. p. 365-385.
- SAUNDERS, D. A.; HOBBS, R. J.; MARGULES, C. R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**, v.5, n. 1, p.18-32. Mar. 1991.
- SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M.S.; BAWA, K.; SEBBEN, A.M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estruturação genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart.. **Revista do Instituto Florestal**, v. 17, n. 1, p. 25-43. 2005.
- SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBEN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, v. 57, p. 123-139. 2000.
- SHAFFER, M. Minimum populations sizes for species conservation. **Bioscience**, [S.I.], v.31, p.131-134, fev. 1981.
- SILVERTOWN, J. W.; DOUST, J. L. **Introduction to plant population biology**. Oxford: Blackwell Sci. 1993, p. 210.

- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments: A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234. 2000.
- SLOOP, C. M.; EBERL, R.; AYRES, D. R. Genetic diversity and structure in the annual vernal pool endemic *Limnanthes vinculans* Ornduff (Limnanthaceae): implications of breeding system and restoration practices. **Conserv Genet**, v. 13, p. 1365–1379. 2012.
- SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. 2012. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica Período 2011-2012**. Relatório Técnico. 61p. Disponível em: http://www.sosma.org.br/link/atlas2011-12/ATLAS_apresentacao_2011_2012_COLETIVA.pdf Acesso: 04, Nov, 2013.
- STEINER, J.J.; GREENE, S. L. Proposed ecological descriptors and their utility for plant germplasm collections. **Crop Sci.**, v. 36, 1996.
- TARAZI, R.; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. Fine-scale spatial genetic structure and allozymic diversity in natural populations of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Conservation Genetics**, Arlington, v. 11, n. 3, p. 965-976, may. 2009.
- TEMPLETON, A. R. et al. The genetics consequences of habitat fragmentation. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 77, n. 1, p. 13-27, 1990.
- TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. Isoenzimas: variabilidade genética em plantas. **SBG**, Ribeirão Preto, p. 186, 1995.
- van OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P. M., SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes** v. 4, p. 535 – 538. 2004.
- VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. **Brazilian Journal of Genetics**, [S.l.], v. 15, p. 53-60, 1992.
- WANG, J. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. **Genet Res**, v. 89, p. 135–153, 2007.
- WANG, J. COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. **Mol Ecol Resour**, v. 11, p. 141–145. 2011.
- WARE, D.; JAISWAL, P.; NI, J.; PAN, X.; CHANG, K.; CLARK, K.; TEYTELMAN, L.; SCHMIDT, S.; ZHAO, W.; CARTINHO, S.; MCCOUCH, S.; STEIN, L. Gramene: a resource for comparative grass genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 103–105. 2002.
- WEIR, B. S. **Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates. 1996. p. 455.
- WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H. Fragmentation in Central American dry forests: genetic impacts on *Swietenia humilis* (Meliaceae). In: YOUNG, A. G.; CLARKE, G. M. (eds). *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 293–311. 2000.

WILSON, G. A.; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics**, [S.l.], v. 163, n. 3, p. 1177– 1191, mar. 2003.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, [S.l.], v.19, n.3, p.395-420, sep. 1965.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. **Popgene: version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for population genetics analysis**. 1999. Disponível em: [≤http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf](http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf) Acesso em: 03 Jan 2014.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluation of the natural monement populations of *Camellia japonica* (Theearaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, [S.l.], v. 37, p. 141-146, 1996.

YOUNG, A.; BOYLE, T. Forest Fragmentation. *In* Forest conservation genetics: principles and practice. A. YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (eds.) **CSIRO Publishing**, Collingwood, p.123-132. 2000.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, A. H. D. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends Ecol Evol**, v. 11, p. 413–418. 1996.