



JAQUELINE FIDELIS DUARTE

**ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL E
TEMPORAL DE *Calyptanthes clusiifolia* EM
FRAGMENTOS NO SUL DE MINAS GERAIS**

LAVRAS – MG

2016

JAQUELINE FIDELIS DUARTE

**ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL E TEMPORAL DE *Calyptanthes
clusifolia* EM FRAGMENTOS NO SUL DE MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. DULCINÉIA DE CARVALHO

LAVRAS – MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Duarte, Jaqueline Fidelis.

Estrutura genética espacial e temporal de *Calypttranthes
clusiifolia* em fragmentos no sul de Minas Gerais / Jaqueline Fidelis
Duarte. – Lavras : UFLA, 2016.

79p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Dulcinéia de Carvalho.

Bibliografia.

1. Conservação Genética. 2. Microssatélites. 3. Fragmentação
Florestal. 4. Myrtaceae. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

JAQUELINE FIDELIS DUARTE

**ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL E TEMPORAL DE *Calyptranthes
clusiifolia* EM FRAGMENTOS NO SUL DE MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 03 de agosto de 2015.

Dr. Alison Gonçalves Nazareno	USP
Dr. Fábio de Almeida Vieira	UFRN
Dr. Rubens Manoel dos Santos	UFLA
Dra. Sheila Valéria Álvares Carvalho	UFS

Dra. Dulcinéia de Carvalho
Orientadora

LAVRAS – MG

2015

*Esta Tese é dedicada aos meus pais, Cleusa e Sebastião,
às minhas irmãs, Joice e Josiane e ao meu sobrinho Heitor,
amores para toda a vida.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras que proporcionou minha formação profissional e pessoal, lugar para o qual sempre terei muito carinho e lembranças memoráveis desde os tempos de graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado concedida.

À Dra. Dulcineia de Carvalho, minha orientadora pela sua atenção, disponibilidade e carinho em todos os momentos.

Ao Prof. Rubens Manoel dos Santos, pela disponibilidade durante o doutorado, pelo auxílio com as coletas do material e nos momentos de dúvida.

Aos membros da banca; Dr. Alison Nazareno, Dr. Fábio Vieira, Dra. Sheila Carvalho e Dr. Rubens Santos, pela participação, correções e sugestões na tese.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, ao professor Dr. Anderson José e ao secretário do PPGEF Juliano de Freitas, pelo auxílio prestado durante estes anos.

Ao Laboratório de Melhoramento Genético e Recursos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foi realizada uma importante etapa do presente trabalho. Em especial, ao Dr. Alison Gonçalves Nazareno, por todo o auxílio prestado durante o desenvolvimento dos primers, tratamento e análise dos dados.

À querida amiga Sheila Carvalho que foi um dos pilares para que esse trabalho pudesse ser realizado, mesmo com todos os percalços e uma tese a ser escrita, sua disponibilidade no acompanhamento em laboratório nunca será esquecida. Com certeza, nossas confabulações acerca da conservação de espécies, da ecologia, da genética de populações procurando resolver os porquês, ajudaram demais na minha formação.

As minhas queridas menininhas, Nayara e Rute, agradeço imensamente não só pelo auxílio no laboratório, mas pela amizade e carinho que vocês tiveram sempre por mim.

Aos amigos do Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas que tornaram meu dia-a-dia mais prazeroso durante estes anos: Luis Eduardo Silva, Sidney Velloso, à dupla Allan Magalhães e Isaiás Paulino, Larissa Visotto,

Josina Carvalho, Lucas Rosado, Joelma Pádua, Paula Coelho, Kelly Bocanegra, Vivette Appolinário, Tâmara Jerônimo, Ivete Maluleque, Natália Reguera, Murilo Malveira, Maria Fernanda Maia Ferreira, e a todos que passaram por ali.

À querida Chica (Francisca Corrêa) pela amizade, carinho de mãe que me acolheu no DCF e com quem pude conviver durante esses anos.

Àqueles que estiveram presentes e talvez nem perceberam como suas palavras serviram de apoio em diversos momentos, agradeço pela amizade e carinho, à querida Gabriela Coelho, Paola Ferreira, Jean Morel, Gisele Menino e Écio Diniz (que sofreu nas coletas de *Calypttranthes*!).

À todos os alunos que fizeram a disciplina de Fragmentação Florestal e coletaram parte das amostras de *Calypttranthes* utilizados neste estudo, o meu reconhecimento no trabalho que sei que vocês tiveram!

À Superintendência de Meio Ambiente da Copasa: Tales Heliodoro, Silvana Vaz e Luciana Aguiar que me deram suporte para que eu pudesse finalizar a tese. Aos colegas Juliane Ruas, Fernanda Souza, Vanderlúcio Rocha, Karoline Tenório, Philippe Santos, Roberto Carvalho, Mônica Mabub, Cida, Norma, Geraldo Davino e a todos que não citei aqui, pelo apoio e encorajamento frente ao cansaço ‘estampado na cara’.

Ao Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz pela etapa desenvolvida no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, representado pela Elisângela Cotes e também à Roberta de Ramos, por toda a atenção e disponibilidade em me atender sempre que necessitei.

Aos amigos que ganhei nesses 10 anos em Lavras!

Àquelas de sempre: Ligiane Moras, Adriana Gouveia, Anna Carolina Tristão, Cintia Gandini, Maria Fernanda Maia Ferreira, Raíssa Baêta que estiveram sempre presentes e que compreenderam minhas ausências e meus desabafos.

À minha irmã Josiane, cuidando sempre, aguentando as enxaquecas que essa tese intensificava, os momentos de desespero e as angústias. Ainda bem que os momentos mais tensos destes últimos anos não chegam nem perto do tanto que aproveitamos ‘essa’ Lavras! Valeu a pena!

À Joice e ao Jardel que não mediram esforços ao me receber, pelo apoio nessa finalização do doutorado.

À minha família: Cleusa, Sebastião, Joice, Jardel e avós que entenderam desde sempre que eu precisei estar ausente para alcançar meus objetivos.

Ao Heitor que veio me dar o ânimo de uma nova vida e que nem imagina quanta força me deu para finalizar esta tarefa.

Enfim, Àquele que me sustenta hoje e sempre: Deus!

“...Mas quem disse que é fácil ser feliz?!
Nem tudo é fácil na vida... Mas, com certeza, nada é impossível...
Precisamos acreditar, ter fé e lutar
Para que não apenas sonhemos, Mas também tornemos todos estes desejos,
realidade!”

Cecília Meireles

RESUMO GERAL

A maioria dos estudos relacionados ao processo de fragmentação tem como foco a quantificação da riqueza de espécies, a estrutura e dinâmica de populações, a alteração nos processos ecológicos, entre outros. Porém, com a rapidez que as florestas estão sendo reduzidas, torna-se necessário investigar quais os efeitos da fragmentação no ponto de vista da diversidade genética, para que medidas voltadas à conservação de habitats sejam realmente efetivas. Para avaliar os efeitos da fragmentação em espécies arbóreas é importante levar em consideração que o seu tempo de vida é, muitas vezes, superior ao processo de fragmentação em determinada área e, por isso, dependendo do tipo de amostragem, estes efeitos podem ficar ocultos. Assim, utilizar uma amostragem que possibilite abranger diferentes gerações, pode aumentar as chances de se retratar um panorama mais realista sobre a dinâmica genética em uma população. Outro ponto importante a ser estudado é a possibilidade de comparar áreas com diferentes origens de formação, como por exemplo, fragmentos remanescentes de atividades antrópicas comparados a fragmentos de origem natural. Para o presente trabalho, foi investigado como a fragmentação florestal pode influenciar na dinâmica genética e estrutura genética espacial. Para isso, a espécie arbórea *Calyptrocalyx clusiifolia* foi amostrada em duas áreas fragmentadas. Foram desenvolvidos sete marcadores microssatélites polimórficos para que a diversidade genética da espécie pudesse ser avaliada. Em cada área de estudo, houve a coleta de indivíduos em dois anos diferentes, totalizando 680 amostras. A diversidade genética nos grupos regenerantes das duas áreas foi menor em relação aos grupos amostrados no primeiro ano de coleta, demonstrando diferença na dinâmica genética temporal. Quanto à estruturação genética espacial, esta foi registrada nos quatro grupos coletados, ou seja, não se pode afirmar que a fragmentação estaria influenciando a distribuição não aleatória dos indivíduos nestas áreas.

Palavras-chave: Conservação genética. Microssatélites. Fragmentação florestal. Myrtaceae.

GENERAL ABSTRACT

Most of the studies related to the fragmentation process focuses on the quantification of species richness, population structure and dynamics, changes in ecological processes, among others. But, because forests are being rapidly destroyed, it is necessary to investigate what are the effects of fragmentation on the point of view of genetic diversity, ensuring that the habitat conservation measures be really effective. To evaluate the effects of fragmentation on tree species it is important to take into consideration that their lifetime is often higher than the fragmentation process in a given area and, therefore, depending on the type of sampling, these effects can be hidden. Thus, using a sampling that allows embracing different generations, it can increase the chances to describe a more realistic overview of the genetic dynamics in a population. Another important point to be studied is the possibility of comparing areas with different origins, such as remaining fragments of human activities compared to naturally occurring fragments. In this study, we investigated how forest fragmentation can influence the genetic dynamics and spatial genetic structure. For this, the tree species *Calyptrocalyx clusiifolia* was sampled in two fragmented areas. Seven polymorphic microsatellite markers were developed to assess the genetic diversity of the species. In each study area, 680 individuals were collected in two different years. The genetic diversity value was lower in regenerating groups of the two areas than the sampled groups in the first year of collection, showing differences in temporal genetic dynamics. Spatial genetic structure was detected within the four groups sampled, that is, it can not be asserted that fragmentation would be influencing the non-random distribution of individuals in these areas.

Key-words: Conservation genetics. Microsatellites. Forest fragmentation. Myrtaceae.

APRESENTAÇÃO

No Brasil, a fragmentação de habitats é um processo antigo que remonta aos primórdios da colonização. A Mata Atlântica que originalmente se estendia por aproximadamente 1.300.000 km² do território brasileiro, foi bastante devastada devido aos processos de urbanização e expansão das fronteiras agrícolas, e hoje seus poucos remanescentes encontram-se fragmentados e dispersos, correspondendo a somente 8,5% da floresta original.

Apesar do grande número de pesquisas sobre o tema fragmentação, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas, já que ainda são desconhecidas, muitas das consequências em longo prazo dos efeitos do processo de fragmentação sobre a diversidade de espécies e sobre os processos ecológicos, nas diversas fitofisionomias encontradas no bioma Mata Atlântica.

Visto que esses processos e serviços ambientais prestados devem ser avaliados dentro de um contexto multidisciplinar, a conservação genética, é uma linha de pesquisa crescente que, por meio das técnicas moleculares, procura entender os processos históricos que podem provocar mudanças na diversidade genética das espécies e, conseqüentemente, nas populações.

Diante deste contexto, a ideia inicial com o presente trabalho partiu da disciplina Fragmentação Florestal que é oferecida pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Lavras. O objetivo maior com o projeto foi avaliar e comparar dentro de um contexto multidisciplinar, os possíveis efeitos do processo de fragmentação sobre a comunidade arbórea. Para isso, tanto os parâmetros ecológicos quanto genéticos, foram considerados.

Para comparar a fragmentação, duas áreas reconhecidas como fragmentos de floresta estacional semidecidual do bioma Mata Atlântica,

encontradas no sul de Minas Gerais, foram amostradas. Uma destas áreas é um fragmento de origem antrópica, inserido em uma matriz agrícola e, o outro, é um fragmento que teve sua formação de modo natural, e a matriz de seu entorno é característica de vegetação nativa campestre, encontrada nas cotas mais elevadas da região.

Para a avaliação ecológica e genética foi escolhida uma espécie arbórea que apresentasse ocorrência nas áreas amostradas. Assim, foi verificado que a espécie *Calypthrantes clusiifolia* O. Berg (Myrtaceae) poderia ser utilizada neste projeto.

Os parâmetros ecológicos que já foram avaliados para a espécie estão descritos em dois trabalhos: um artigo sobre a estrutura das duas áreas amostradas (MOREL et al., 2014), e o outro é uma dissertação sobre a dinâmica populacional na área de fragmento natural (SANTOS, 2014).

Para o presente trabalho, os parâmetros genéticos de *C. clusiifolia* foram utilizados para caracterizar a dinâmica genética temporal e a estrutura genética espacial em cada fragmento e, posteriormente, comparar estes resultados procurando identificar uma possível influência do processo de fragmentação.

A tese foi dividida em duas partes, sendo que a primeira apresenta o referencial teórico com os principais temas abordados no trabalho, e a segunda parte está dividida em dois artigos.

O primeiro artigo descreve o desenvolvimento de marcadores microssatélites para a espécie *Calypthrantes clusiifolia*, já que, até o presente momento, não existe em literatura registro desse tipo de marcador para esta espécie. Além disso, não foram detectados estudos prévios com *C. clusiifolia* na área de conservação genética.

O segundo artigo compara se o processo de fragmentação influencia a variabilidade genética no tempo e no espaço. Para isso, os níveis de diversidade genética foram avaliados temporalmente, comparando dados de amostras

coletadas em diferentes anos e, especialmente, por meio dos coeficientes de coancestria e da estrutura genética espacial.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Considerações sobre a Mata Atlântica e o processo de fragmentação ...	18
2.2 Fragmentação de habitat.....	20
2.3 Conservação genética	22
2.4 Marcadores moleculares microssatélites	25
2.5 <i>Calyptranthes clusiifolia</i> O. Berg – Myrtaceae.....	27
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	30
REFERÊNCIAS.....	31
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	38
ARTIGO 1 - Desenvolvimento de marcadores microssatélites para <i>Calyptranthes clusiifolia</i> (Myrtaceae).....	39
ARTIGO 2 - Diversidade e dinâmica genética temporal de <i>Calyptranthes clusiifolia</i> em floresta estacional semidecidual.....	51

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A destruição da vegetação nativa e a conseqüente perda de biodiversidade resultante da expansão das atividades socioeconômicas são o foco da maioria dos estudos em biologia da conservação. Dentro desta linha, existe uma produção constante de pesquisas relacionadas à genética de população de plantas e aos efeitos da fragmentação de habitat. Como exemplo, podem ser citadas algumas pesquisas desenvolvidas com espécies arbóreas tropicais encontradas na Mata Atlântica: *Myrcia splendens*, *Schinus terebintifolius*, *Manilkara maxima*, *Metrodorea nigra*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Pouteria reticulata* e *Euterpe edulis* (BRANDÃO et al, 2015; CARVALHO et al., 2015; GANZHORN et al., 2015; MORAES FILHO; BONIFÁCIO-ANACLETO; ALZATE-MARIN, 2015; MOREIRA et al., 2015; SCHROEDER; TRAN; DICK, 2014; VIEIRA et al., 2010).

Contudo, a investigação dos efeitos da fragmentação sobre a diversidade genética, geralmente não utiliza uma amostragem que possibilite diferenciar cada uma das gerações passíveis de serem encontradas na população, ou seja, a dinâmica genética da espécie fica em segundo plano.

Algumas considerações são necessárias quando se propõe realizar estudos visando à compreensão dos efeitos da fragmentação na diversidade genética de espécies arbóreas, pois, geralmente, eles são bastante complexos e controversos. Segundo os princípios da conservação genética, as conseqüências genéticas da fragmentação seriam a redução do fluxo gênico e perda de alelos e, ao longo de gerações, aumentaria os efeitos de deriva genética e de endogamia, diminuiria a heterozigosidade e o poder adaptativo, além de elevar a diferenciação genética entre populações (PIOTTI, 2009; YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996).

Assim como esperado, AGUILLAR et al. (2008) observaram que a fragmentação reduziu a diversidade genética em espécies comuns e de reprodução cruzada. Porém, Kramer et al. (2008) defenderam que espécies arbóreas seriam capazes de manter sua variabilidade genética ao apresentarem extenso fluxo gênico que contraporaria o efeito de deriva genética.

Portanto, é importante realizar estudos nos quais a estrutura genética seja investigada em diferentes gerações nas populações, pois as mudanças na variabilidade genética de espécies arbóreas podem levar algumas gerações para que sejam realmente detectadas (HONNAY et al.; 2005; YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996). Além disso, a possibilidade de comparar populações em fragmentos de habitat com histórias de formação diferenciadas pode ajudar a elucidar se a resposta de uma espécie ao processo de fragmentação estaria relacionada às suas características intrínsecas, ou de maneira mais generalizada à interação com os fatores ecológicos.

O processo de fragmentação de habitats no Brasil remonta ao início de sua colonização e, devido ao processo de urbanização e expansão agropecuária, a Mata Atlântica, mais precisamente uma de suas fitofisionomias, a floresta estacional semidecidual, foi bastante devastada e hoje está reduzida a pequenos fragmentos isolados (OLIVEIRA-FILHO; SCOLFORO; MELLO, 1994). Este cenário é característico da região do Alto Rio Grande, sul de Minas Gerais, onde o presente trabalho foi desenvolvido em dois fragmentos florestais, um de ocorrência natural delimitado por campo de altitude e outro remanescente da substituição da vegetação por pastagens.

Assim, com o presente estudo objetivou-se verificar qual a influência do processo de fragmentação na diversidade genética de populações de espécies arbóreas. Para isso, foi realizada a análise da estrutura genética espacial e temporal da espécie arbórea *Calypttranthes clusiifolia* (Miq) O. Berg (Myrtaceae), de ocorrência comum nos fragmentos estudados, onde apresenta

tanto indivíduos adultos como regenerantes. A obtenção dos dados foi feita pela análise de marcadores moleculares do tipo microssatélite especialmente desenvolvidos para este estudo.

Espera-se que (i) exista diferença entre a diversidade genética de populações encontradas em um fragmento florestal natural daquelas em fragmento de origem antrópica sendo deste último menor e (ii) indivíduos regenerantes que ocorrem em populações fragmentadas apresentem estruturação genética espacial e temporal, de um possível cruzamento entre indivíduos aparentados ou mesmo de autocruzamento.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações sobre a Mata Atlântica e o processo de fragmentação

O processo de destruição das florestas no Brasil tem seus registros iniciais após a chegada dos primeiros estrangeiros. Com o bloqueio das rotas comerciais para o Oriente, a exploração de produtos florestais tornara-se um meio econômico altamente lucrativo e, nesse momento, iniciou-se a intensa exploração do pau-brasil, que no final do século XV, já estava praticamente esgotado da costa brasileira (BRASIL, 2010; TONHASCA JUNIOR, 2005).

A ocupação do território brasileiro ficou durante muito tempo restrita à sua porção litorânea e as atividades econômicas que se desenvolveram ao longo da colonização, como o ciclo da cana-de-açúcar, a atividade pecuária, o cultivo de cacau e a cafeicultura, ocorreram em detrimento da Mata Atlântica. Assim, ao longo da história brasileira, a Mata Atlântica foi devastada sem nenhuma consideração de cunho conservacionista e hoje restam menos de 10% da floresta original que, apesar de ser protegida pela Constituição brasileira, está sob constante ameaça devido às atividades agropecuárias, à extração ilegal de

madeiras e à especulação imobiliária, já que aproximadamente 60% da população brasileira reside nestas áreas anteriormente ocupadas pela Mata Atlântica (BRASIL, 2010; TONHASCA JUNIOR, 2005).

A Mata Atlântica é reconhecida por conter um nível de endemismo elevado e grande diversidade de espécies (cerca de 20.000 espécies de angiospermas, 850 de aves, 370 de anfíbios, 200 de répteis, 270 de mamíferos e 350 espécies de peixes) que, somados à ameaça de destruição de habitats, possibilitou a sua classificação como um hotspot de biodiversidade prioritário para conservação (BRASIL, 2010; MYERS et al., 2000). Esta alta biodiversidade pode ser resultado da interação de variados tipos de solo e relevo, do regime pluviométrico, das diferentes altitudes e da extensão latitudinal desse bioma. Assim, inserido nesse bioma podem ser encontradas várias fitofisionomias como as formações florestais e ecossistemas associados como floresta ombrófila densa e mista, floresta estacional semidecidual e decidual, manguezais, restingas, brejos, campos de altitude, encraves de savana e savana estépica (BRASIL, 2010; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2012).

Em Minas Gerais, a Mata Atlântica ocupa 10,3% do território atualmente, o que corresponde a pequenos remanescentes florestais resultantes do desmatamento para expansão das culturas agrícolas e a pecuária, urbanização, desenvolvimento industrial e corte para produzir carvão vegetal (BRASIL, 2010; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2015). Segundo Oliveira-Filho, Scolforo e Mello (1994), dentre as fitofisionomias florestais no centro-sul de Minas Gerais, a floresta estacional semidecidual sofreu grande redução já que, em sua área de ocorrência, são encontrados solos férteis muito visados para a atividade agropecuária (OLIVEIRA-FILHO; SCOLFORO; MELLO, 1994). Na região do Alto Rio Grande, sul de Minas Gerais, a estrutura fragmentada da paisagem é

decorrente do processo de ocupação onde existem pequenos fragmentos deixados nos limites das propriedades e faixas estreitas de vegetação nos chamados ‘valos’. Estes valos foram construídos por meio de mão-de-obra escrava nas propriedades para dividir suas glebas e impedir a passagem de gado. Além disso, eram uma alternativa à construção de muros de pedra quando não havia disponibilidade dessas na região. Estes valos foram sendo colonizados pela vegetação do entorno e formaram corredores de vegetação nativa que são amplamente encontrados na região (CASTRO, 2004).

Ainda dentro da bacia do Alto Rio Grande também podem ser encontrados fragmentos florestais formados por processos naturais de longo prazo. Estes fragmentos são cercados por vegetação campestre e rupestre nativas dominantes nas serras de rochas quartzíticas (MOREL et al., 2014; RODELA, 1998; VASCONCELOS, 2011).

2.2 Fragmentação de habitat

A fragmentação do habitat pode ser conceituada como um processo onde uma paisagem anteriormente grande e contínua tem sua área reduzida e dividida em fragmentos (BALDI; GUERSCHMAN; PARUELO, 2006; PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Este processo é considerado uma das maiores ameaças à biodiversidade e pode ocorrer de forma natural ou ter origem em atividades antrópicas. Dentre os fatores que influenciam no processo de fragmentação natural podem ser citados a topografia, mudanças climáticas, heterogeneidade dos solos, processos hidrogeológicos entre outros (CONSTANTINO et al., 2003). Quanto à antrópica, geralmente ocorre rapidamente e em larga escala espacial e suas consequências na estrutura de uma população podem ser variadas, sendo isso fonte de maiores questionamentos sobre quais seriam as

alterações nos processos ecológicos e genéticos (OLIFIERS; CERQUEIRA, 2006).

Porém, remanescentes florestais encontrados na paisagem nem sempre serão resultantes do processo de fragmentação. Muitas vezes, uma mancha florestal pode estar relacionada à expansão da vegetação por mecanismos como nucleação, avanço de espécies florestais na borda do fragmento e de invasão e aglomeração de arbustos nos campos. Dentre as formações vegetacionais encontradas no estado de Minas Gerais, estão os campos de altitude e, entremeados à vegetação herbácea em áreas com maior umidade, ocorrem fragmentos florestais que podem ser resultantes da expansão florestal (MATTE; MÜLLER; BECKER, 2015).

As espécies não respondem igualmente às alterações do habitat, elas são afetadas em graus diferenciados (REED; SHINE, 2002) e como as paisagens são naturalmente heterogêneas, a existência de uma espécie em uma determinada área será em função da distribuição e predominância de habitats favoráveis a ela. Algumas vezes um habitat pode apresentar características ideais para sobrevivência de uma espécie e não ser adequado para outra, ou seja, a espécie não ocorreria neste local (OLIFIERS; CERQUEIRA, 2006). Porém, a rapidez com que a paisagem está sendo modificada nos últimos anos pode impedir que as populações possam se adaptar as novas características daquele habitat (LIENERT, 2004).

Os fragmentos florestais ao perderem área, provocam a exclusão imediata de espécies raras ou distribuídas em manchas e, o isolamento do fragmento pode diminuir ou mesmo eliminar áreas adequadas à colonização por espécies presentes em áreas próximas (BACLES; LOWE; ENNOS, 2004). Além disso, mesmo em espécies abundantes localmente, o isolamento é capaz de aumentar a chance de essa população ser extinta por estocasticidade ambiental (diferenciações no clima, fornecimento de alimento ou patógenos), demográfica

(flutuações do tamanho populacional e fitness) ou por deriva genética (LIENERT, 2004; SHAFFER, 1981).

A ocorrência de espécies vegetais abundantes em determinada área pode desempenhar papel importante no habitat ao oferecer abrigo e alimento a outras espécies. Assim, estudar os efeitos da fragmentação do habitat em espécies de ocorrência comum também pode ser de grande ajuda para entender quais processos podem estar atuando nos remanescentes florestais (LIENERT, 2004; POWER et al. 1996).

2.3 Conservação genética

A diversidade genética é um dos três níveis fundamentais da biodiversidade e, dentro da biologia da conservação, merece atenção frente às atividades humanas que acarretam a redução das populações de espécies da flora e fauna. Assim, esta redução somada ao manejo e conservação é o foco dos estudos em conservação genética, a qual utiliza da teoria e das análises genéticas moleculares para elucidar questões como a perda de diversidade genética e os efeitos deletérios do endocruzamento sobre a sobrevivência de uma espécie (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002).

O potencial adaptativo e evolutivo das populações naturais está associado ao nível de diversidade genética que possuem (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002). Segundo a teoria clássica de genética de populações, a fragmentação reduz o tamanho populacional e aumenta o isolamento entre populações. Estas ao se apresentarem pequenas e isoladas estarão sujeitas à estocasticidade ambiental, demográfica ou genética (SHAFFER, 1981; ALLENDORF; LUIKART, 2007).

A estocasticidade genética é ocasionada pela deriva genética e pela endogamia, resultante de fatores como o tamanho efetivo populacional reduzido

e a diminuição do fluxo gênico. Assim, a perda de variabilidade genética provocaria a perda do fitness e do potencial evolutivo de uma espécie (AGUILAR et al., 2008; DE-LUCAS et al., 2009).

Couvet (2002) relata que o efeito da fragmentação em curto prazo seria a redução da viabilidade e fecundidade de indivíduos – cruzamento entre indivíduos aparentados – devido à depressão endogâmica. Já em longo prazo, com o isolamento das populações, o fluxo gênico ao se tornar reduzido diminuiria a viabilidade dos indivíduos levando a população a ser extinta localmente, pois é este fluxo, o responsável por reintroduzir a variabilidade genética na população e contrapor a fixação de mutações deletérias (COUVET, 2002).

Portanto, em espécies arbóreas o fluxo por meio de pólen e sementes é a força que mantém a coesão genética entre as populações (FUCHS; HAMRICK, 2010; MANOEL et al, 2012). Com isso, ao ocorrer um declínio dos polinizadores e dispersores de sementes, decorrentes do processo de fragmentação, o sucesso reprodutivo da espécie estaria comprometido e seu efeito negativo poderia ser comprovado com a mudança da estrutura genética espacial.

Segundo Aldrich et al. (1998), na maioria dos estudos realizados em populações contínuas de espécies arbóreas tropicais foi observado que as árvores são capazes de manter uma quantidade suficiente de variação genética dentro das populações. Porém, com o avanço da fragmentação, o número de pesquisas relacionadas ao seu efeito aumentou, utilizando como modelo as espécies arbóreas encontradas nessas manchas florestais remanescentes (ALDRICH et al, 1998). Contudo, a avaliação da diversidade genética dessas populações remanescentes, em sua maioria, é realizada somente com indivíduos adultos e isto pode não representar a estruturação genética atual da população, já que as

espécies arbóreas possuem ciclo de vida longo e a maioria dos fragmentos é resultado de desmatamentos recentes (ALDRICH et al, 1998).

Outra consideração a ser feita em relação às espécies arbóreas tropicais é que elas apresentam uma densidade populacional menor quando comparadas às espécies temperadas, tanto nas áreas contínuas ou fragmentadas, e seu sistema reprodutivo é variado, com predominância de polinização por animais (NASON; HAMRICK, 1997). Estas características podem torná-las mais vulneráveis à extinção local devido à fragmentação da paisagem.

Entretanto, existe uma linha de pensamento que vem sendo difundida na comunidade científica onde é argumentado que a degradação genética em florestas tropicais possa estar superestimada, pois as árvores apresentariam uma adaptação à polinização à longa distância e seriam mais resistentes ao isolamento imposto pela fragmentação antrópica (KRAMER et al., 2008). Alguns estudos apresentam evidências de que a conectividade genética ainda é mantida mesmo sob fragmentação, porém também registram o aumento de cruzamento entre indivíduos aparentados (MANOEL et al., 2012) elevando os níveis de endogamia nos indivíduos regenerantes. Outros trabalhos relatam baixos níveis de polimorfismo e aumento de endogamia em populações fragmentadas (MOREIRA; FERNANDES; COLLEVATTI, 2009).

Contudo, independente do ponto de vista, o que se pode perceber é que os efeitos da fragmentação nas características genéticas são muito mais complexos e amplos do que poderiam ser esperados. Isto demonstra a necessidade de se desenvolver estudos com diferentes espécies e que também abordem a dinâmica ecológica e evolutiva (estrutura demográfica, biologia reprodutiva) para que informações mais robustas acerca do processo de fragmentação possam ser obtidas contribuindo na formulação de práticas conservacionistas e de manejo mais adequadas diante à realidade heterogênea das paisagens ambientais (BACLES; LOWE; ENNOS, 2004).

A detecção dos possíveis efeitos do processo de fragmentação pode ser realizada por meio da avaliação da estrutura genética espacial de uma população. A dispersão limitada de pólen e sementes faz com que as populações naturais possuam uma distribuição dos genótipos de modo não aleatório, ou seja, apresentem estrutura genética espacial (EGE) (VEKEMANS; HARDY, 2004). Assim, indivíduos próximos serão mais similares geneticamente do que os mais distantes (VEKEMANS; HARDY, 2004). Com isso, o aumento do cruzamento entre parentes ao longo das gerações provocará um aumento nos níveis de coancestria a curta distância e, com a densidade populacional baixa, a EGE em populações de plantas em áreas fragmentadas poderá aumentar (ALDRICH et al., 1998; DE-LUCAS et al., 2009; MOREIRA; FERNANDES; COLLEVATTI, 2009).

Poucos estudos são feitos levando em consideração a estrutura genética em diferentes estágios de desenvolvimento da planta, ou seja, considerando uma amostragem em diferentes gerações nas populações. Como mudanças na diversidade genética de espécies arbóreas podem levar algumas gerações para serem detectadas, esta abordagem é interessante, pois torna possível compreender como a dinâmica de fluxo de pólen e sementes está ocorrendo dentro das populações estudadas por meio das progênies.

2.4 Marcadores moleculares microssatélites

A caracterização da variabilidade e estrutura genética populacional pode ser feita por meio de marcadores moleculares. Com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) na década de 1980, surgiram diversos métodos para detectar a diversidade genética utilizando marcadores moleculares como o RAPD, AFLP, ISSR e os SSR.

Este último, também denominado de marcador microssatélite (Single Sequence Repeats) é encontrado em abundância no genoma de todos os organismos eucariotos encontrados no planeta (CHAMBERS; MACAVOY, 2000) e, devido sua alta taxa polimórfica aliada a abordagens estatísticas capazes de usufruir melhor dos dados obtidos, é capaz de fornecer estimativas de estrutura, migração e mesmo taxas de parentesco entre os indivíduos (GUICHOUX et al., 2011; MANOEL et al., 2012; SELKOE; TOONEN, 2006).

Os microssatélites são sequências de DNA com 1 a 6 nucleotídeos repetidos *in tandem* – sendo os dinucleotídeos os mais encontrados – distribuídos ao longo do genoma. Eles são classificados como marcadores codominantes, ou seja, todos os alelos no locus de um indivíduo heterozigoto podem ser identificados (CHAMBERS; MACAVOY, 2000; ELLEGREN, 2004; GUPTA et al., 1996).

As sequências microssatélites, durante a replicação do DNA, sofrem mutações que irão mudar o número de repetições e, conseqüentemente, o comprimento da fita. Assim, os alelos ao diferirem no comprimento podem ser distinguidos durante a eletroforese (GUICHOUX et al., 2011; SELKOE; TOONEN, 2006; ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002).

Os SSRs são encontrados preferencialmente em regiões não-codificadoras, assim não sofrem a ação da seleção natural e, por isso, são caracterizados como seletivamente neutros (LI et al., 2002). A sequência de DNA próxima a um locus microssatélite é chamada de região flanqueadora. Estas regiões são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, e o microssatélite pode ser identificado por suas regiões flanqueadoras. Assim, os primers (sequências curtas repetidas no DNA) podem ser desenvolvidos para se ligarem a estas regiões, guiando a amplificação do microssatélite durante a amplificação do DNA (GUPTA et al., 1996; SQUIRRELL et al., 2003; ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002).

Portanto, usar técnicas moleculares pode ajudar em um melhor entendimento sobre questões de conectividade, viabilidade populacional e consequências genéticas em longo prazo da fragmentação de habitats (ALDRICH et al., 1998; BACLES; LOWE; ENNOS, 2004).

2.5 *Calyptranthes clusiifolia* O. Berg – Myrtaceae

A família Myrtaceae compreende aproximadamente 150 gêneros e 3.600 espécies. São identificados dois centros de dispersão destas espécies uma no continente americano, principalmente nas áreas mais tropicais e a outra no sul do continente australiano (CRONQUIST, 1981; SOUZA; LORENZI, 2005).

No Brasil, a família apresenta atualmente 1.034 espécies descritas (SOBRAL et al., 2015) e é reconhecida como uma das famílias mais importantes e mais dominantes na Mata Atlântica (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). Geralmente, as plantas desta família são arbustivas ou arbóreas, com folhas simples de disposição oposta e apresentam pontos translúcidos. A nervura principal geralmente é proeminente e possui nervura marginal coletora. Na maioria das vezes, as flores são brancas (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; SOUZA; LORENZI, 2005).

O gênero *Calyptranthes* pode ser encontrado em todo o Brasil, com 75 espécies registradas dentro dos domínios da Mata Atlântica, do Cerrado, da Caatinga e da Amazônia (SOBRAL et al., 2015). A espécie *Calyptranthes clusiifolia* O. BERG é endêmica do Brasil e sua ocorrência é registrada desde o Norte do país alcançando os estados da região Sul (LANDRUM; KAWASAKI, 1997) em floresta estacional semidecidual e floresta ombrófila (SOBRAL et al., 2015).

Calyptranthes clusiifolia, conhecida popularmente por orelha-de-burro ou araçarana, é uma espécie arbórea que não apresenta diferenciação de

ocorrência quanto à umidade de solo (MOREL et al., 2014) (Figura 1). O processo de polinização é realizado por abelhas e, suas sementes, geralmente produzidas em grande quantidade, são dispersas pela avifauna, por exemplo, a espécie *Penelope superciliaris* (ALVES-COSTA; ETEROVICK, 2007; GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006) tornando *C. clusiifolia* uma espécie interessante para ser utilizada na recuperação de áreas degradadas (GUIMARÃES et al., 2007).



Figura 1. Indivíduos de *Calyptanthes clusiifolia* O. Berg presentes em fragmento florestal no sul de Minas Gerais

Fonte: Arquivo pessoal.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os padrões de estrutura genética em indivíduos adultos refletem o acúmulo dos efeitos relacionados aos processos de fragmentação ocorridos no passado, já a estrutura em indivíduos regenerantes será resultado de processos mais recentes.

Como o processo de fragmentação na maioria das vezes é mais recente comparado à longevidade das espécies arbóreas, a avaliação da diversidade tanto no tempo como no espaço pode ser capaz de retratar com maior veracidade quais as consequências da redução do tamanho populacional e do isolamento entre fragmentos.

A maioria dos estudos em conservação genética visa caracterizar a variabilidade genética em espécies arbóreas caracterizadas como raras e que muitas vezes se encontram na lista de espécies ameaçadas, porém, espécies abundantes em uma área merecem atenção, pois podem responder até de maneira mais imediata às mudanças ocorridas em determinado habitat além de refletir o comportamento de outras espécies em sua área de ocorrência.

A proposta com este trabalho foi comparar dois fragmentos florestais, um natural e outro com histórico de uso antrópico, por meio da avaliação da diversidade genética de uma espécie arbórea com ocorrência em ambos a fim de minimizar os possíveis fatores extrínsecos. Espera-se que os resultados fornecidos aqui possam solucionar algumas questões acerca da fragmentação de habitats e conservação de populações arbóreas.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 24, p. 5177-5188, Dec. 2008.

ALDRICH, P. R. et al. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 8, p. 933-944, Jan. 1998.

ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the Genetics of Populations**. Blackwell, Padstow. 2007. 642 p.

ALVES-COSTA, C. P.; ETEROVICK, P. C. Seed dispersal services by coatis (*Nasua nasua*, Procyonidae) and their redundancy with other frugivores in southeastern Brazil. **Acta Oecologica**, Montrouge, v. 32, n. 1, p. 77-92, Jul./Aug. 2007.

BACLES, C. F. E.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* in a deforested Scottish landscape. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 573-584, Mar. 2004.

BALDI, G.; GUERSCHMAN, J. P.; PARUELO, J. M. Characterizing fragmentation in temperate South America grasslands. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdã, v. 116, p. 197-208, Sept. 2006.

BRANDÃO, M. M. et al. Genetic diversity of neotropical tree *Myrcia splendens* (Myrtaceae) in a fragment-corridor system in the Atlantic rainforest. **Flora**, Jena, v. 216, p. 35-41, Sept. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros**. Brasília, 2010. 408 p.

CARVALHO, S.V.A. et al. *Schinus terebinthifolius*: Population structure and implications for its conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 58, p. 120–125, Feb., 2015.

CASTRO, G.C. **Análise da estrutura, diversidade florística e variações espaciais do componente arbóreo de corredores de vegetação na região do Alto Rio Grande, MG**. 2004. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

CHAMBERS, G.K.; MACAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, Oxford, v. 126, p 455–476, Aug. 2000.

CONSTANTINO, R.; et al. Causas Naturais. In: RAMBALDI, D.M.; OLIVEIRA, D.A.S. (Orgs.). **Fragmentação de Ecossistemas**: Causas efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Brasília, MMA, 2003. 510p.

COUVET, D. Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. **Conservation Biology**, Malden, v. 16, n. 2, p. 369-376, Apr. 2002.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia: University Press, New York. 1981. 1262 p.

DE-LUCAS, A. I. et al. Spatial genetic structure in continuous and fragmented populations of *Pinus pinaster* Aiton. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 4564-4576, Sept. 2009.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 5, p. 435-445, Jun. 2004.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge University Press, Cambridge. 2002, 617 p.

FUCHS, E. J.; HAMRICK, J. L. Genetic Diversity in the Endangered Tropical Tree, *Guaïacum sanctum* (Zygophyllaceae). **Journal of Heredity**, Washington, v. 101, n. 3, p. 284-291, Feb. 2010.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2013-2014**, São Paulo, 2015.

GANZHORN, S. M. et al. Effects of fragmentation on density and population genetics of a threatened tree species in a biodiversity hotspot. **Endangered Species Research**, Oldendorf/Luhe, v. 26, p. 189–199, Jan. 2015.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 29, p. 509-530, Oct./Dec. 2006.

GUICHOUX, E. et al. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 591-611, Jul. 2011.

GUIMARÃES, D. et al. Influência de Diferentes Substratos e Níveis de Temperatura Sobre o Processo Germinativo de Sementes de *Calypttranthes clusiifolia* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 816–818, Jul. 2007.

GUPTA, P.K. et al. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, Bangalore, v. 70, p. 45-54, Jan. 1996.

HONNAY, O. et al. Forest fragmentation effects on patch occupancy and population viability of herbaceous plant species. **New Phytologist**, Londres, v. 166, p. 723–736, Jun. 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/manuais_tecnicos/manual_tecnico_vegetacao_brasileira.pdf >. Acesso em: 25 abr. 2015.

KRAMER, A. T. et al. The Paradox of Forest Fragmentation Genetics. **Conservation Biology**, Malden, v. 22, n. 4, p. 878-885, Dec. 2008.

LANDRUM, L.; KAWASAKI, M. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, New York, v. 49, n. 4, p. 508-536, Dec. 1997.

LI, Y.C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, n. 12, p. 2453-2465, Dec. 2002.

LIENERT, J. Habitat fragmentation effects on fitness of plant populations – a review. **Journal for Nature Conservation**, Jena, v. 12, p. 53-72, Jul. 2004.

MANOEL, R. et al. Contemporary pollen flow, mating patterns and effective population size inferred from paternity analysis in a small fragmented population of the Neotropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Conservation Genetics**, Netherlands, v. 13, n. 3, p. 613-623, Jun. 2012.

MATTE, A.L.L.; MÜLLER; S.C.; BECKER, F.G. Forest expansion or fragmentation? Discriminating forest fragments from natural forest patches through patch structure and spatial context metrics. **Austral Ecology**, Carlton, v 40, p. 21-31, Feb. 2015.

MORAES FILHO, R.M.; BONIFÁCIO-ANACLETO, F.; ALZATE-MARIN, A.L. Fragmentation effects and genetic diversity of the key semideciduous forest species *Metrodorea nigra* in Southwestern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 2, p. 3509 – 3524, Apr. 2015.

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**, Amsterdã, v. 258, n. 12, p. 2690-2695, Nov. 2009.

MOREIRA, P.A. et al. Genetic diversity and structure of the tree *Enterolobium contortisiliquum* (Fabaceae) associated with remnants of a seasonally dry tropical forest. **Flora**, Jena, v. 210, p. 40–46, Oct./Nov. 2015.

MOREL, J.D. et al. Population structure of *Calyptranthes clusiifolia* O.Berg in two patches in the southern Minas Gerais state. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n.5, p.924-937, Oct. 2014.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853–858, Feb. 2000.

NASON, J. D.; HAMRICK, J. L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: Two case studies of neotropical canopy trees. **Journal of Heredity**, Washington, v. 88, n. 4, p. 264-276, Jul. 1997.

OLIFIERS, N.; CERQUEIRA, R. Fragmentação de habitat: efeitos históricos e ecológicos. In: ROCHA, C.F.D. et al. (Ed.). **Biologia da conservação: essências**. São Carlos: Rima, 2006. p. 261-279.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; SCOLFORO, J. R.; MELLO, J. M. Composição florística e estrutura comunitária de um remanescente de floresta semidecídua montana em Lavras (MG). **Revista Brasileira de Botânica, São Paulo**, v. 17, n. 2, p. 159-174, Dec. 1994.

PIOTTI, A. The genetic consequences of habitat fragmentation: the case of forests. **iForest**, v. 2, p. 75-76. 2009.

POWER, M. E. et al. Challenges in the quest for keystones. **Bioscience**, Oxford, v. 46, p. 609–620, Sept. 1996.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina, Gráfica Editora Midiograf, 2001. 328p.

REED, R. N.; SHINE, R. Lying in wait for extinction: ecological correlates of conservation status among Australian elapid snakes. **Conservation Biology**, Malden, v. 16, n. 2, p. 451-461, Apr. 2002.

RODELA, L. G. Cerrados de altitude e campos rupestres do Parque Estadual do Ibitipoca, sudeste de Minas Gerais: distribuição e florística por subfisionomias da vegetação. **Revista do Departamento de Geografia**, São Paulo, n. 12, p. 163-189, Jun. 1998.

SANTOS, P.F. **Ecologia comportamental de *Calypttranthes clusiifolia* O. Berg. (Myrtaceae) em uma área naturalmente fragmentada de Floresta Estacional Semidecidual Altomontana situada na serra de Carrancas, sul de Minas Gerais**. 2014. 46p. Dissertação (Mestrado Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SCHROEDER, J.W.; TRAN, H.T.; DICK, C.W. Fine scale spatial genetic structure in *Pouteria reticulata* (Engl.) Eyma (Sapotaceae), a dioecious, vertebrate dispersed tropical rain forest tree species. **Global Ecology and Conservation**, Amsterdã, v. 1, p. 43-49, Jul. 2014.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 615-629, Dec. 2006.

SHAFFER, M.L. Minimum population sizes for species conservation. **BioScience**, Oxford, v 31, p. 131-134, Feb. 1981.

SOBRAL, M. et al.. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10266>>. Acesso em: 10 Fev. 2015

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Plantarum, Nova Odessa, 2005.

SQUIRRELL, J. et al. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p.1339-1348, Jan. 2003.

TONHASCA JUNIOR, A. **Ecologia e história natural da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Interciência, 2005. 198 p.

VASCONCELOS, M. F. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 241-246, Apr./Jun. 2011

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 921-935, Apr. 2004.

VIEIRA, F. A. et al. Spatial pattern and fine-scale genetic structure indicating recent colonization of the palm *Euterpe edulis* in a Brazilian Atlantic forest fragment. **Biochemical Genetics**, New York, v. 48, p. 96-103, Feb. 2010.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v 11, p. 413-418, Oct. 1996.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 1-16, Sept. 2002.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

**ARTIGO 1 - Desenvolvimento de marcadores microssatélites para
Calyptranthes clusiifolia (Myrtaceae)**

JAQUELINE FIDELIS DUARTE¹

**Artigo formatado de acordo com as NBR 6022 (ABNT, 2003) com
adaptações segundo o Manual de normalização da UFLA.**

¹ Bióloga – Universidade Federal de Lavras
Mestre em Ecologia Aplicada – UFLA
Email: jaquefdbio@hotmail.com

RESUMO

No Brasil, a família Myrtaceae é reconhecida como uma das mais dominantes na Mata Atlântica e mais importantes ecologicamente, já que seus frutos servem como alimento à fauna. Pertencente a essa família, a espécie arbórea *Calyptranthes clusiifolia* ocorre nas fitofisionomias de floresta ombrófila e floresta estacional semidecidual e, por isso, ela foi utilizada em estudos de genética de populações para investigar a influência do processo de fragmentação nos parâmetros de diversidade genética. Como não há registro de desenvolvimento de SSRs para o gênero *Calyptranthes* e nem para a espécie até o presente momento, foi desenvolvida uma biblioteca enriquecida de microssatélite para a espécie *C. clusiifolia*. Para a caracterização dos marcadores, dez indivíduos de três fragmentos florestais localizados em Minas Gerais foram coletados e o DNA extraído. Sete marcadores foram polimórficos e resultaram em um total de 23 alelos. A heterozigosidade média esperada variou de 0,14 (Caly 06) a 0,73 (Caly 22). Não foi detectado desequilíbrio de ligação entre os pares de loci ($p > 0,0007$). O poder de exclusão parental do primeiro (Pe-1) e segundo (Pe-2) parente foi de 0,6099 e 0,8548, respectivamente. Os iniciadores desenvolvidos aqui são indicados para estudos que buscam caracterizar a diversidade e estrutura genética das populações naturais de *C. clusiifolia*.

Palavras-chave: Diversidade Genética. Marcadores SSR. Mata Atlântica. Myrtaceae.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a família Myrtaceae apresenta atualmente 1034 espécies distribuídas em 23 gêneros (SOBRAL et al., 2015) e é reconhecida como uma das famílias mais dominantes na Mata Atlântica (LANDRUM; KAWASAKI, 1997) e mais importantes ecologicamente, já que seus frutos servem como alimento à fauna (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006). Dentre os gêneros desta família, *Calyptranthes* pode ser encontrado em todo o Brasil, com 75 espécies registradas dentro dos domínios Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Amazônia (SOBRAL et al., 2015). A espécie *Calyptranthes clusiifolia* O. Berg é endêmica do Brasil e sua ocorrência é registrada desde o Norte do país alcançando os estados da região Sul (LANDRUM; KAWASAKI, 1997) nas fitofisionomias floresta estacional semidecidual e floresta ombrófila (SOBRAL et al., 2015). *Calyptranthes clusiifolia*, é uma espécie arbórea, tolerante à sombra e não apresenta diferenciação de ocorrência quanto à umidade de solo (MOREL et al., 2014). O processo de polinização é realizado por abelhas e, suas sementes, geralmente produzidas em grande quantidade, são dispersas pela avifauna (ALVES-COSTA; ETEROVICK, 2007), tornando *C. clusiifolia* uma espécie interessante para ser utilizada na recuperação de áreas degradadas (GUIMARÃES et al., 2007).

Como a espécie *C. clusiifolia* é uma espécie de ocorrência comum em fragmentos florestais ela foi utilizada para o desenvolvimento de primers específicos para posteriormente serem empregados para investigar o tipo de influência do processo de fragmentação na genética de populações arbóreas. Os parâmetros de diversidade genética podem ser obtidos por meio de marcadores moleculares. Dentre eles, os marcadores microsatélites (SSR – Simple Sequence Repeats) que apresentam modo de herança codominante, estão amplamente distribuídos no genoma das espécies e apresentam alto grau de

polimorfismo decorrente da elevada taxa de mutação (ELLEGREN, 2004; SELKOE; TOONEN, 2006). Assim, visando a realização de estudos genéticos em populações de *C. clusiifolia*, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar marcadores microssatélites, já que não existe registro de desenvolvimento de SSRs para o gênero *Calyptanthes* e nem para a espécie até o presente momento.

2.MATERIAL E MÉTODOS

A construção da biblioteca enriquecida de sequências microssatélites foi realizada no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina. O DNA genômico foi extraído da amostra foliar de um indivíduo de *C. clusiifolia* segundo o protocolo de Doyle e Doyle (1987). A enzima de restrição *RsaI* foi usada para digerir 120 ng de DNA genômico, e os fragmentos foram ligados aos adaptadores da *RsaI* [*Rsa21* (5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3') e *Rsa25* (5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3')]. Oligonucleotídeos biotinizados (CT)₈, (GT)₈ e (CTT)₈ foram usados para o enriquecimento da biblioteca genômica e, os fragmentos de DNA que possuíam os microssatélites foram recuperados pela ligação entre as moléculas de biotina e as moléculas de streptavidina utilizando Streptavidin Magne Sphere Paramagnetic Particles (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA).

Os fragmentos SSR selecionados foram ligados a um vetor pGEM-T Easy (Promega) e os plasmídeos foram introduzidos em células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue. As células transformadas foram plaqueadas em meio sólido (contendo ampicilina e X-galactosidase). As colônias recombinantes obtidas foram sequenciadas em sequenciador automático ABI 377 usando o Kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems).

O software WebSat (MARTINS et al., 2009) foi usado para identificar os microssatélites e os pares de primers complementares às regiões flanqueadoras foram desenhados com o software PRIMER3 (UNTERGASSER et al., 2012) seguindo as configurações: tamanho do produto de 100 a 300 bp, tamanho do primer 18 a 22 bp, porcentagem de GC de 40 a 60% e temperatura de anelamento variando entre 57 a 60 °C. No total, 26 pares de primers foram desenhados. A validação dos primers e otimização das condições de PCR foram realizadas por meio de amplificações dos fragmentos de DNA de seis indivíduos (três populações com 2 indivíduos em cada). O volume total de cada reação foi de 16,5 µl: 3 ng de DNA adicionados a 13,5 µl de mix de reação [3,33 mM de tampão IB Phoneutria (constituído de 100 mM de Tris-HCl pH 8,4; 500 mM de KCl; 1% Triton X-100; 15 mM de MgCl₂), 0,28 mM de dNTP, 1U de Taq polimerase, 0,22 mM de cada primer]. O programa de amplificação constituiu de iniciação de 2 minutos em 94 °C, seguido por 30 ciclos de desnaturação em 94 °C por 15 segundos, temperatura de anelamento (ver Quadro 1) por 15 segundos, extensão em 72 °C, por 30 segundos e, seguido por uma extensão final a 72 °C, por 5 minutos. As amplificações ocorreram em termogradiante (MJ Mini™ Gradient ThermalCycler, Bio-Rad Laboratories, Inc).

Os amplicons foram submetidos à eletroforese vertical em géis de poliacrilamida 8% em cuba vertical com tampão TBE 1X a uma corrente constante de 45 mA durante 4h. Após a corrida o gel foi colocado em solução corante de nitrato de prata (0,2% AgNO₃) e agitado durante 10 minutos com ausência de luz. O gel foi enxaguado em água ultrapura e mergulhado em solução reveladora (3% de NaOH, 0,5% de formaldeído e 500 mL de água destilada) e agitado durante 10 minutos. O tamanho dos alelos foi estimado usando DNA ladder de 10 pb (Invitrogen). Dez primers que tiveram produtos amplificados mais robustos e com o tamanho de pares de base esperado foram selecionados.

Para caracterizar o polimorfismo nos loci obtidos, 10 indivíduos de três populações foram coletados em fragmentos florestais localizados em Minas Gerais: População 1 (21°27' 12"S, 44° 37'31"W), População 2 (21°18'15" S, 44°59'21" W) e População 3 (21°13'40"S, 44°57'50"W). O DNA genômico foi extraído seguindo o mesmo protocolo Doyle e Doyle (1987). A amplificação do DNA foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 9700. O programa e o mix para amplificação dos marcadores otimizados durante a validação dos primers, diferiram no número de ciclos e nos valores do tampão IB, respectivamente (Quadro 1). A concentração de Magnésio diferenciou para cada primer de acordo com a sua expressão nos géis. Assim, a concentração do tampão no protocolo 1 foi de 3,33 mM, no protocolo 2, foi de 2 mM e no protocolo 3, foi de 1,5 mM. A eletroforese dos produtos amplificados seguiu o mesmo procedimento utilizado durante a validação dos primers.

As estimativas dos parâmetros genéticos foram realizadas com base na genotipagem dos 30 indivíduos amostrados. A presença de alelos nulos foi analisada pelo método Brookfield 1 com 1000 permutações no software MICRO-CHECKER 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004).

Quadro 1. Caracterização de 10 loci microssatélites para *Calyptanthes clusiifolia*.

n° de acesso GenBank	Locus	Sequência de primers (5'-3')	Repeat motif	Variação	Ta	Ciclo	Prot.
KR999964	Caly 03	F: TGATATAGGTGGCGGGATGT	(TC)6	190-192	58 °C	30	1
		R: AGTGAGGATGCGTTGGAAAG					
KR999963	Caly 04A	F: TGTGGAATCATTGCTCAAGTC	(GA)23	200-220	62 °C	30	2
		R: GACCGTGGGTGAATGAGAAC					
KR999965	Caly 06	F: AACTGTGCCACGTTTATTGG	(TTTCT)3	240-250	64 °C	30	2
		R: TGTGATCAAGACCCATCTGAG					
KR999966	Caly 09	F: GTGACAAGAAGGGCAAGAGC	(CCA)4	151-160	64 °C	28	3
		R: CATCTGGCTGCACTACATGC					
KR999967	Caly 14	F: TCCGAGGTTTTCTGTTTTCG	(TC)12	153-171	50 °C	32	1
		R: GCGGTGCAGTTTGTCTACA					
KR999968	Caly 15	F: GGGGAGCCAACTCACACTAC	(GAA)17	139-160	58 °C	30	2
		R: CCCAGAGTTTCAATTCATTCTG					
KR999969	Caly 22	F: AGAGGGTCAGCTCTATTTTGGA	(TC)12	210-264	56 °C	30	2
		R: CTCCATATCATCGCCAGAG					
KR999970	Caly 08	F: AGAGGTTGGAGAAGGCGATT	(TG)8...(TG)6...(TG)6	190	66 °C	28	3
		R: GCCACATCTTGACACACTC					
KR999971	Caly 17	F: CGAATGCACAACATGCAATA	(AATAA)3	180	57 °C	27	2
		R: TTTTGCATGCTACCTCGTC					
KR999972	Caly 20	F: TCGGTCAACACAAAGCACAC	(CA)5...(CA)6	200	64 °C	28	3
		R: CATTGGAGGCGGAAAATAGA					

Variação: variação no tamanho dos alelos; Ta: temperatura de anelamento; Ciclo: n° de ciclos de amplificação de DNA utilizados para cada locus; Prot.: número do protocolo utilizado (Prot. 1 - 3,33 mM de Magnésio; Prot. 2 - 2 mM de Magnésio; Prot. 3 - 1,5 mM de Magnésio)

O número efetivo de alelos (A_e) foi obtido com o auxílio do programa MSA (DIERINGER; SCHLÖTTERER, 2003). Os valores de heterozigosidade esperada (H_e), observada (H_o) e desequilíbrio de ligação foram calculados no programa FSTAT (GOUDET, 2002). A probabilidade de exclusão de paternidade para cada locus e a probabilidade combinada para todos os loci foi calculada para o primeiro parente (Pe-1), ou seja, quando nenhum dos pais é conhecido, e segundo parente (Pe-2), quando o genótipo de um dos pais é conhecido, no programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 26 pares de primers isolados e validados, 10 amplificaram fragmentos com os tamanhos esperados sendo que destes, sete foram polimórficos (Quadro 2). Geralmente, a abordagem em genética de populações utiliza a variação de tamanho dos SSR devido à maior facilidade de serem genotipados, com isso, os microssatélites que não apresentam variação no tamanho dos alelos são descartados das análises (NAZARENO; REIS, 2011). Porém, Nazareno e Reis (2011) demonstraram, por meio do sequenciamento de um locus monomórfico desenvolvido para a espécie *Butia eriospatha* Mart. Ex Drude, que existe variação na sequência do alelo devido à inserções e substituições de nucleotídeos. Assim, a avaliação dos loci monomórficos de *C. clusiifolia* pode ser futuramente realizada para verificar se existe variação na sequência complementando os estudos de diversidade genética, além de ser uma alternativa quando a espécie não apresenta uma quantidade necessária de marcadores polimórficos.

O conjunto de marcadores desenvolvidos neste trabalho resultou em 23 alelos, sendo que o número de alelos por locus variou entre 2 (Caly 03, Caly 06

e Caly 09) a 6 (Caly 22) e a riqueza alélica variou de 1,88 (Caly 06) a 4,40 (Caly 22) entre os loci (Quadro 2). A heterozigosidade média esperada foi de 0,39 e a observada de 0,29. Quanto ao desequilíbrio de ligação, os valores entre todos os pares de loci SSR não foram significativos ($p > 0,0007$). Os primers Caly 03, Caly 04A, Caly 22 apresentaram indícios de alelos nulos, porém este resultado pode ser reflexo do pequeno tamanho amostral utilizado.

Os valores da probabilidade de exclusão para o primeiro parental (Pe-1), variaram de 0,0117 (Caly 06) a 0,3004 (Caly 22) e, para segundo parental (Pe-2) variaram de 0,0706 (Caly 06) a 0,4731 (Caly 22). Porém, a análise combinada resultou em valores baixos de Pe que foi de 0,6099 para Pe-1 e 0,8548 para Pe-2. Este poder de exclusão indica a capacidade de um locus em não excluir um indivíduo erroneamente ao determinar um parentesco. Assim, quando o poder de discriminação dos marcadores se apresenta mais baixo, o desenvolvimento de mais marcadores pode ser uma alternativa.

4. CONCLUSÃO

Os sete marcadores SSR obtidos neste estudo serão úteis em estudo posteriores para examinar padrões de diversidade e estrutura genética em populações de *Calyptanthes clusiifolia* presentes em diferentes fragmentos florestais.

Quadro 2. Resultados dos parâmetros genéticos número de alelos (A), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), frequência de alelos nulos (Anull), alelos efetivos (Ae), probabilidade de exclusão do primeiro (Pe-1) e segundo (Pe-2) parental analisados para *Calyptanthes clusifolia*.

Locus	A	Ho	He	Anull	Ae	Pe-1	Pe-2
Caly 03	2	0	0,25	0,24	1,97	0,0267	0,1022
Caly 04A	3	0,1	0,45	0,24	2,71	0,1118	0,2210
Caly 06	2	0,17	0,14	0	1,88	0,0117	0,0706
Caly 09	2	0,59	0,42	0	1,99	0,0859	0,1643
Caly 14	4	0,67	0,61	0	3,94	0,2734	0,4414
Caly 15	4	0,17	0,18	0	2,48	0,0173	0,0948
Caly 22	6	0,34	0,73	0,32	4,40	0,3004	0,4731
Média	-	0,29	0,39	-	-	-	-
Total	23	-	-	-	-	0,6099	0,8548

REFERÊNCIAS

- ALVES-COSTA, C. P.; ETEROVICK, P. C. Seed dispersal services by coatis (*Nasua nasua*, Procyonidae) and their redundancy with other frugivores in southeastern Brazil. **Acta Oecologica**, Montrouge, v. 32, n. 1, p. 77-92, Jul./Aug. 2007.
- DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, p. 167–169, Aug. 2003.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3.2. 2002. Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 29, p. 509-530, out./dez. 2006.
- GUICHOUX, E. et al. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 591-611, Jul. 2011.
- GUIMARÃES, D. et al. Influência de Diferentes Substratos e Níveis de Temperatura Sobre o Processo Germinativo de Sementes de *Calyptanthus clusifolia* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 816–818, jul. 2007.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, Mar. 2007.

LANDRUM, L.; KAWASAKI, M. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, New York, v. 49, n. 4, p. 508-536, Dec. 1997.

MARTINS, W.S.; et al. WebSat - A Web Software for Microsatellite Marker Development, **Bioinformatics**, Singapore, v. 3, n. 6, p. 282-283, Jan. 2009.

MOREL, J.D. et al. Population structure of *Calypttranthes clusiifolia* O.Berg in two patches in the southern Minas Gerais state. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n.5, p.924-937, Oct. 2014.

NAZARENO, A.G.; REIS, M.S. The same but different: Monomorphic microsatellite markers as a new tool for genetic analysis. **American Journal of Botany**, Baltimore, v.98, p. 265-267, Oct. 2011.

SOBRAL, M. et al. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10266>>. Acesso em: 10 Fev. 2015

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Plantarum, Nova Odessa, 2005.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. 15, p. 115-115, Aug. 2012. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/40/15/e115.abstract>>.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, p. 535–538, Sept. 2004.

ARTIGO 2 - Diversidade e dinâmica genética temporal de *Calyptanthes clusiifolia* em floresta estacional semidecidual

JAQUELINE FIDELIS DUARTE¹²

Artigo formatado de acordo com as NBR 6022 (ABNT, 2003) com adaptações segundo o Manual de normalização da UFLA.

² Bióloga – Universidade Federal de Lavras
Mestre em Ecologia Aplicada – UFLA
Email: jaquefdbio@hotmail.com

RESUMO

A investigação da estrutura genética em diferentes gerações nas populações arbóreas é uma estratégia válida e importante quando se pretende investigar as consequências do processo de fragmentação de hábitat. Isto porque, geralmente, os efeitos da fragmentação florestal na diversidade genética levam gerações para serem detectados. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da fragmentação na estrutura genética espacial e dinâmica genética temporal da espécie *Calyptranthes clusiifolia* (Myrtaceae), comparando uma área de fragmento natural com uma área de fragmento antrópico. Os DNAs de 680 indivíduos de quatro grupos (Lavras, Regenerantes Lavras, Carrancas e Regenerantes Carrancas) foram amplificados com quatro primers SSR previamente desenvolvidos para esta espécie. Os *loci* não apresentaram desequilíbrio de ligação e, por isso, puderam ser utilizados em todas as análises. Foi observado que a fragmentação influenciou na dinâmica genética temporal, já que os parâmetros de diversidade genética foram menores nos grupos de regenerantes de Lavras e de Carrancas. Os coeficientes de endogamia foram maiores nos grupos de fragmento natural. A diferenciação genética entre os grupos regenerantes foi elevada sendo o valor de $Nm = 1,77$. Todos os grupos avaliados apresentaram estruturação genética espacial, ou seja, e EGE detectada não esteve relacionada ao processo de fragmentação.

Palavras-chave: Myrtaceae. SSR. Fragmentação. Regenerantes. Conservação Genética.

1. INTRODUÇÃO

A fragmentação de habitat é reconhecida como uma das principais causas de perda de biodiversidade em todo o planeta (AGUILAR et al., 2008). No Brasil, desde a sua colonização, a perda de espécies da fauna e flora foi registrada e muitas fitofisionomias foram bastante devastadas, como por exemplo, a floresta estacional semidecidual que se encontra reduzida a pequenos fragmentos isolados (OLIVEIRA-FILHO; SCOLFORO; MELLO, 1994).

De acordo com a teoria de genética de populações, o processo de fragmentação provocaria a redução do fluxo gênico e a perda de alelos, e, ao longo de gerações, aumentaria a endogamia e os efeitos de deriva genética, diminuiria a heterozigosidade e o poder adaptativo e, por fim, elevaria a diferenciação genética entre populações (PIOTTI, 2009; YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996).

Porém, é preciso considerar que estes efeitos podem ser complexos e controversos. Entre os resultados encontrados em literatura, já foi observado que a fragmentação reduziu a diversidade genética em espécies comuns e de reprodução cruzada (AGUILLAR et al., 2008). Ao contrário, outros autores defendem que espécies arbóreas seriam capazes de manter sua variabilidade genética ao apresentarem extenso fluxo gênico que contraporaria o efeito de deriva genética (KRAMER et al., 2008).

Qiu et al. (2013) argumentam que a estrutura genética de uma população adulta é o resultado de processos ecológicos e evolutivos e que, apesar de vários estudos terem sido realizados com diferentes espécies vegetais, eles não tinham o foco voltado para a estrutura genética dos diferentes estágios de vida de uma espécie (QIU et al., 2013). Portanto, é importante realizar estudos nos quais a estrutura genética seja investigada em diferentes gerações nas populações, pois as mudanças na diversidade genética de espécies arbóreas podem levar algumas

gerações para serem detectadas (HONNAY et al.; 2005; YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996). Além disso, a possibilidade de comparar populações de uma mesma espécie em fragmentos de habitat que apresentam origens de formação diferentes pode ajudar a elucidar se a resposta de uma espécie ao processo de fragmentação estaria relacionada às suas características intrínsecas, ou de maneira mais generalizada, à interação com os fatores ecológicos.

Com o presente trabalho objetivou-se avaliar a influência do processo de fragmentação na estrutura genética espacial e dinâmica genética temporal em populações de espécies arbóreas sendo utilizada como modelo, a espécie arbórea *Calyptanthes clusiifolia* (Miq) O. Berg (Myrtaceae). Os dados genéticos foram obtidos por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélite previamente desenvolvidos para esta espécie. As áreas de estudo foram escolhidas por serem ambas fragmentos florestais, com características ambientais parecidas, porém o processo de formação deles foi diferente. Um deles é remanescente da substituição da vegetação ao redor pela agricultura, ou seja, de origem antrópica. O segundo fragmento, teve sua formação ocorrida de forma natural e está delimitado por vegetação campestre nativa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Duas áreas foram amostradas em dois fragmentos florestais que tiveram origem de maneira diferente. Ambos os fragmentos são classificados como remanescentes de Floresta Estacional Semidecidual (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2012) e apresentam em comum um gradiente ambiental já que, em seu interior, podem ser encontrados solos hidromórficos e

diferença topográfica. A distância entre os dois fragmentos é de 41 km (Figura 1).

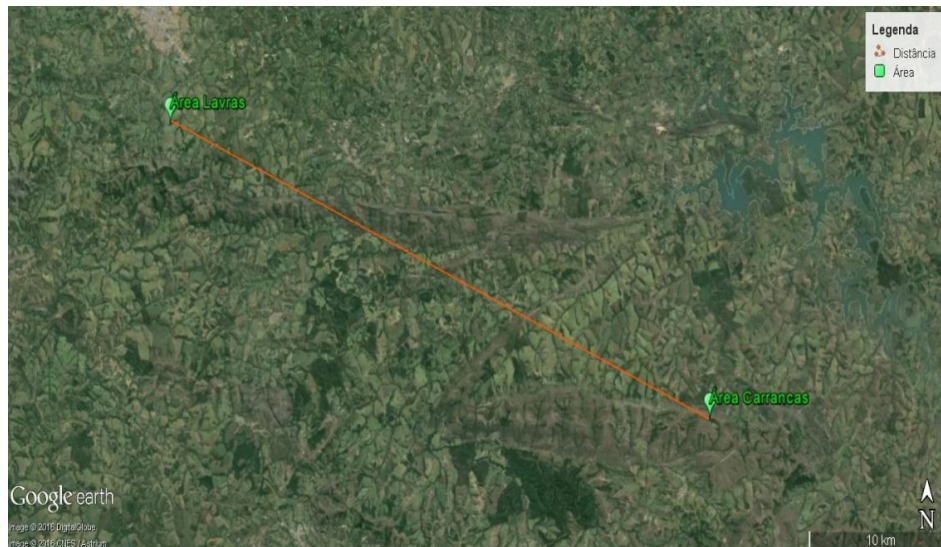


Figura 1. Áreas de coleta indicadas no mapa e distância de 41 km entre elas.

A primeira área está situada no município de Lavras, Minas Gerais sob as coordenadas geográficas de $21^{\circ}18'15''S$ e $44^{\circ}59'21''W$ e, para este trabalho, foi considerada como um fragmento de origem antrópica (LAV), o qual se encontra inserido em uma matriz com cultivo de soja e é interligado por corredores de vegetação a outros fragmentos (Figura 2). Nesta área existe um curso d'água que somado à topografia mais plana forma uma área levemente pantanosa (MOREL et al., 2014).



Figura 2. Área de coleta de *Calyptanthes clusiifolia* no município de Lavras, Minas Gerais, o transecto amostrado está representado em amarelo.

A segunda área está situada na Serra de Carrancas, no município de Carrancas, Minas Gerais sob as coordenadas geográficas de 21°27'12"S e 44°37'31"W e foi considerada como fragmento natural (CAR) inserido em uma paisagem de campo de altitude (Figura 3). Segundo Morel et al. (2014), o fragmento é cortado por um curso d'água em um declive de 2 m de profundidade.



Figura 3. Área de coleta de *Calypttranthes clusiifolia* no município de Carrancas, Minas Gerais, o transecto amostrado está representado em amarelo.

Em cada área, um transecto (30 x 110 m) foi estabelecido propiciando a amostragem de indivíduos ocorrentes em microambientes diferentes. Os indivíduos de *Calypttranthes clusiifolia* foram identificados em campo com plaquinhas numeradas, suas amostras foliares foram coletadas e suas localizações geográficas registradas (coordenadas X,Y).

Nos dois transectos, a primeira coleta foi realizada no ano de 2010, e amostraram-se todos os indivíduos presentes. Assim, no transecto Lavras, em 2010, foram coletados 48 indivíduos e em Carrancas foram coletados 418 indivíduos. Para analisar a estrutura genética temporal, em 2011, uma nova amostragem nos transectos foi realizada. Os novos indivíduos encontrados foram também plaqueteados, georreferenciados e suas amostras coletadas. Assim, no transecto Lavras foram coletados 55 regenerantes e, em Carrancas 5.223 regenerantes. Porém, para as análises fez-se uma reamostragem e somente 168 regenerantes desta área foram utilizados.

Na Figura 4 é possível observar a distribuição dos indivíduos baseada nas classes de altura utilizadas por Morel et al (2014).

Para as análises subsequentes as amostragens foram consideradas com a seguinte denominação: LAV – Amostragem em Lavras 2010, RL – regenerantes de Lavras 2011, CAR – Carrancas em 2010 e RC – regenerantes de Carrancas em 2011.

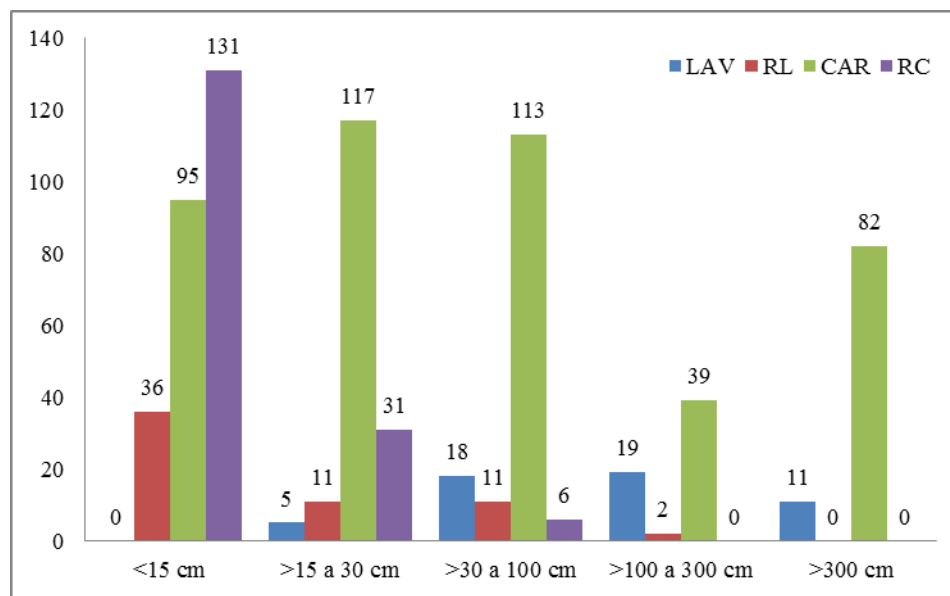


Figura 4. Distribuição dos indivíduos amostrados de *Calyptrocalyx clusiifolia* em cinco classes de altura (em centímetros). O número de indivíduos está indicado acima das barras.

Extração do DNA genômico e amplificação

No Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas – DCF, Universidade Federal de Lavras, a extração do DNA foi realizada por meio do protocolo CTAB 2% (DOYLE; DOYLE, 1987). Para a amplificação de DNA, quatro primers SSR desenvolvidos para *C. clusiifolia* (Capítulo 1) marcados na sequência forward (5') foram utilizados: Caly 03, Caly 04, Caly 14 e Caly 15, sendo usadas as fluorescências VIC, NED, 6-FAM (nos dois últimos), respectivamente. As condições específicas do mix de reação e programa de amplificação foram descritas no Capítulo 1.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3730 (Life Technologies) utilizando o marcador

de tamanho GS500 LIZ. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

Os picos gerados foram visualizados e genotipados com o software GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems).

Análises estatísticas

- Diversidade genética dos loci

O teste de desequilíbrio de ligação foi calculado entre todos os pares de locos para verificar se dois locos não segregam independentemente um do outro. A significância do teste foi calculada por 120 permutações e correção de Bonferroni (95%) no software FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). O resultado deste teste determina se os locos utilizados para este estudo estão adequados para as análises genéticas posteriores.

A frequência de alelos nulos por locus em cada grupo (LAV, RL, CAR e RC) foi estimada no programa FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007) com 1000 aleatorizações pelo método do algoritmo de Dempster, Laird e Rubin (1977), que, de acordo com Chapuis e Estoup (2007), apresenta melhor performance comparado a outros estimadores.

A caracterização dos locos microssatélites obtidos para a espécie foi realizada por meio dos índices: número de alelos observados por loco (A), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), amplitude no tamanho dos alelos calculados com auxílio do programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2002).

- Diversidade e dinâmica genética temporal nos grupos

Para cada grupo foi avaliado se existe desvio em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), por meio do teste de Fisher, com auxílio do

algoritmo de cadeia de Markov para estimar o valor de p exato sem desvios (GUO; THOMPSON, 1992; WEIR, 1996) no programa GENEPOP *on the web* (RAYMOND; ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008).

A diversidade genética nos quatro grupos foi avaliada em relação ao número médio de alelos observados (A_o) e efetivos (A_e), número médio de alelos exclusivos (A_{ex}), heterozigosidade esperada e observada no GenAIEx 6.501 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012) e os coeficientes de endogamia (F_{IS}) foram obtidos pelo software FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2002).

Para avaliar se os grupos passaram por efeito gargalo recente foi realizado o teste de aderência ao equilíbrio de mutação e deriva por meio do software Bottleneck 1.2.02 (CORNUET; LUIKART, 1996). Os modelos mutacionais mais indicados para marcadores do tipo microssatélites são o SMM (Modelo simples de mutação) e o TPM (modelo de duas fases de mutação) e, por isso, foram analisados neste trabalho. A significância estatística foi obtida por meio do teste de Wilcoxon – o mais indicado para um menor número de loci (< 20 loci) – com 10.000 permutações.

O tamanho efetivo populacional (N_e) foi calculado para cada grupo baseado no método proposto por Vencovsky (1997) pela seguinte fórmula:

$$N_e = \frac{n}{(1+f)} \quad \text{onde } n \text{ é o número total de indivíduos amostrados na}$$

população e f é o coeficiente de endogamia da população.

Os coeficientes de diferenciação genética entre os grupos foram calculados por meio do coeficiente de diferenciação G'_{ST} (HEDRICK, 2005) e do coeficiente D_{est} (JOST, 2008) no software GenAIEx 6.501 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012). O cálculo dos valores de F_{ST} também foi realizado por meio do software FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007), o qual é capaz de fazer a correção das frequências genotípicas caso a evidência de alelos nulos fosse detectada.

O cálculo do fluxo gênico ou número de migrantes (Nm) pode ser realizado a partir do método de alelos privados ou pode ser baseado em F_{ST} . Neste estudo optou-se por utilizar o método baseado em F_{ST} (GenAlEx) pois, o Nm obtido por meio da frequência de todos os alelos pode ser mais robusto do que calculado a partir da frequência de alelos privados.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada para verificar como a variabilidade genética de *Calyptanthes clusiifolia* está distribuída entre as áreas Lavras e Carrancas e dentro de cada área (LAVxRL; CARxRC). A significância estatística foi obtida com 1.000 permutações utilizando o software ARLEQUIN v.3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

- Estrutura genética espacial

A estrutura genética espacial (EGE) em cada área de coleta foi avaliada por meio de correlograma em que o coeficiente de coancestria (LOISELLE et al.,1995) foi calculado entre os indivíduos para classes de distância que foram definidas de acordo com os critérios presentes no manual do software usado; a significância dos dados foi avaliada por teste de permutação (1000 permutações) e o erro padrão foi obtido por jackknife. As estimativas foram realizadas pelo software SPAGeDi (HARDY; VEKEMANS, 2002). A avaliação da estrutura foi realizada por comparação dentro de cada área de coleta (LAV e RL; CAR e RC) por meio da quantificação da EGE pela estatística S_p

$$S_p = \frac{-b_{Log}}{1 - F_{(1)}}$$

onde,

b_{Log} é a inclinação da curva de regressão do coeficiente de coancestria;

$F_{(1)}$ é a média do coeficiente de coancestria da primeira classe de distância (F_{ij})

O parâmetro S_p é utilizado porque o valor de b_{Log} geralmente varia em função do tipo de amostragem utilizada, assim, ao utilizar o S_p , Vekemans e Hardy (2004) argumentam que pode-se fazer a comparação da magnitude da EGE entre populações ou mesmo espécies.

3. RESULTADOS

- Diversidade genética dos *loci*

Dentre os 680 indivíduos amplificados com quatro *loci* microsatélites, a comparação entre pares de *loci* não detectou valores significativos de desequilíbrio de ligação (valores de p ajustados a 5% de significância) (Tabela 1). A frequência de alelos nulos foi significativa para o *locus* Caly 14 nos quatro grupos amostrados. Em Caly 03, Caly 15 e Caly 22, a maioria dos grupos teve frequência significativa como pode ser observado na Tabela 2.

Os quatro *loci* microsatélites foram altamente polimórficos com um total de 67 alelos que variaram entre 14 e 21 alelos. Quanto à heterozigosidade esperada para o conjunto dos *loci* foi encontrado um valor de 0,674 e para a heterozigosidade observada, 0,465 (Tabela 3).

Tabela 1. Teste de desequilíbrio de ligação entre pares de *loci* microsatélites para a espécie *Calyptanthes clusiifolia*.

Pares de <i>loci</i>	Estimativa
Caly03 X Caly14	0,7583
Caly03 X Caly15	0,2250
Caly03 X Caly22	0,1083
Caly14 X Caly15	0,9000
Caly14 X Caly22	0,1083
Caly15 X Caly22	0,0167

p= 0,0083 – correção de Bonferroni

Tabela 2. Estimativa de frequência de alelos nulos em cada locus, nos quatro grupos amostrados de *Calytranthus clusiifolia*

	LAV	CAR	RL	RC
Caly 03	0,0453 ^{ns}	0,0734*	0,0597*	0,0411 ^{ns}
Caly 14	0,1031*	0,1927*	0,1271*	0,1600*
Caly 15	0,0244 ^{ns}	0,2073*	0,1298*	0,2408*
Caly 22	0,0733*	0,1461*	0,7527*	0,0410 ^{ns}

ns= não significativo; * = significativo a 5%

Tabela 3. Diversidade genética para cada loco microssatélite em indivíduos de *Calytranthus clusiifolia*.

Loci	A	Amplitude	H _o	H _e
Caly 03	14	178-206	0,255	0,293
Caly 14	16	151-181	0,585	0,884
Caly 15	16	124-175	0,491	0,755
Caly 22	21	204-260	0,528	0,763
Média	17		0,465	0,674
Total	67			

A= número de alelos observados; Amplitude= amplitude alélica; H_o= heterozigidade observada;

H_e= heterozigidade esperada.

- Diversidade e estrutura genética temporal nos grupos

Os quatro grupos apresentaram desvio em relação às proporções esperadas pelo modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O número médio de alelos observado foi de 11,37 e de alelos efetivos foi de 3,85. Em ambos os parâmetros, os grupos da área de fragmento natural (CAR e RC) apresentaram valores maiores (Tabela 4). O grupo CAR teve maior média de alelos exclusivos (3,25), já os Regenerantes Lavras (RL) não apresentaram alelos exclusivos. A heterozigidade esperada (H_e) foi mais alta em LAV (0,68) seguida por CAR

(0,65), sugerindo uma tendência de redução da diversidade nos grupos que possuíam somente regenerantes. O coeficiente de endogamia (F_{IS}) foi positivo e significativamente diferente de zero, variando entre 0,12 e 0,39 (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização genética dos grupos de *Calyptanthes clusiifolia*.

Grupo	N	A_o	A_{ef}	A_{ex}	H_e	H_o	F_{IS}
LAV	48	10,00	3,73	0,5	0,68	0,60	0,12
RL	55	8,50	3,44	0	0,61	0,46	0,25
CAR	418	15,75	4,40	3,25	0,65	0,40	0,39
RC	159	11,25	3,84	0,25	0,59	0,39	0,33
Média		11,37	3,85		0,63	0,46	

N= número de indivíduos amostrados; A_o = média de alelos observados; A_{ef} =média de alelos efetivos; A_{ex} =média de alelos exclusivos; H_e =heterozigidade esperada; H_o =heterozigidade observada; F_{IS} =coeficiente de endogamia.

Nos testes de desequilíbrio de mutação e deriva, o excesso de heterozigidade não foi detectado em nenhum dos grupos para nenhum dos modelos mutacionais (TPM e SMM), o que pode demonstrar que os grupos não passaram por efeito gargalo recente. Ao contrário, como pode ser visto na Tabela 5, foi detectada uma deficiência de heterozigidade nos grupos LAV, RL e RC. Quanto ao tamanho efetivo populacional (N_e), em LAV foi de 43 indivíduos, 44 em RL, 301em CAR e 120 em RC.

Tabela 5. Valores de deficiência de heterozigidade resultantes de testes de equilíbrio mutação-deriva em *Calyptanthes clusiifolia*.

	LAV	RL	CAR	RC
TPM	0,06250	0,03125	0,06250	0,15625
SMM	0,03125	0,03125	0,06250	0,03125

ns = não significativo; $p < 0.05$ significativo (deficiência de heterozigidade)

A diferenciação genética entre os grupos CAR e RC, apresentou valores baixos para os coeficientes: $G'_{ST} = 0,052$ e $D_{est} = 0,041$. Já os grupos RL e RC apresentaram os maiores valores de diferenciação $G'_{ST} = 0,305$ e $D_{est} = 0,248$ (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de G'_{ST} (acima da diagonal) e D_{est} (abaixo da diagonal) em *Calypttranthes clusiifolia*

	LAV	RL	CAR	RC
LAV	-	0,052	0,155	0,292
RL	0,042	-	0,144	0,305
CAR	0,128	0,115	-	0,052
RC	0,243	0,248	0,041	-

LAV = Lavras; RL = Regenerantes Lavras; CAR=Carrancas; RC= Regenerantes Carrancas

Devido a detecção de alelos nulos foi calculado o coeficiente de diferenciação removendo os *loci* que foram afetados e com o conjunto total de *loci* pelo programa FreeNA, os valores de F_{ST} obtidos não foram estatisticamente significativos (dados não mostrados), assim, todos os *loci* mostraram-se aptos a serem utilizados para as análises posteriores.

O fluxo gênico (Nm) estimado pelo método indireto entre LAV e CAR foi de 3,47 migrantes, entre LAV e RL foi de 13,39 migrantes, entre CAR e RC foi de 13,49 migrantes e entre RL e RC foi de 1,77 migrantes.

Ao analisar a distribuição da variação genética entre as duas áreas de coleta (Lavras e Carrancas) foi obtido o valor de (17%), entre áreas e dentro dos grupos 2% e dentro dos grupos 81%, demonstrando que existe maior variabilidade dentro dos grupos (Figura 5).

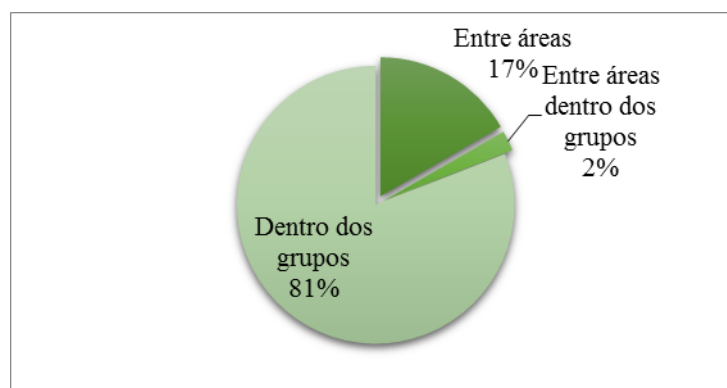


Figura 5. Porcentagem de variância molecular da espécie arbórea *Calypttranthes clusiifolia* em fragmentos no sul de Minas Gerais.

- Estrutura genética espacial

A estruturação genética espacial foi detectada nos quatro grupos LAV, RL, CAR e RC como pode ser visto no correlograma dos coeficientes de coancestria (Figuras 6 e 7). Os coeficientes de coancestria foram positivos e significativos nas 3 classes iniciais de distância nos grupos CAR (26 m; $p < 0,05$) e RC (10 m; $p < 0,05$), em LAV (10 a 14 m; $p < 0,05$) e na primeira classe (3 m; $p < 0,05$) em RL. Quanto ao valor S_p , RC apresentou o maior valor (0,032) seguido de CAR (0,020), já nos grupos da área de Lavras, o valor S_p foi menor (Tabela 7).

Tabela 7. Índices de coancestria obtidos no software SPAGeDi para *Calypttranthes clusiifolia*.

	b_{Log}	F_1	S_p
LAV	-0,017	0,014	0,017
RL	-0,012	0,030	0,013
CAR	-0,019	0,042	0,020
RC	-0,030	0,044	0,032

b_{Log} = inclinação da curva de regressão do coeficiente de coancestria; F_1 = média do coeficiente de coancestria (F_{ij}) na primeira classe de distância; S_p = índice da estatística S_p

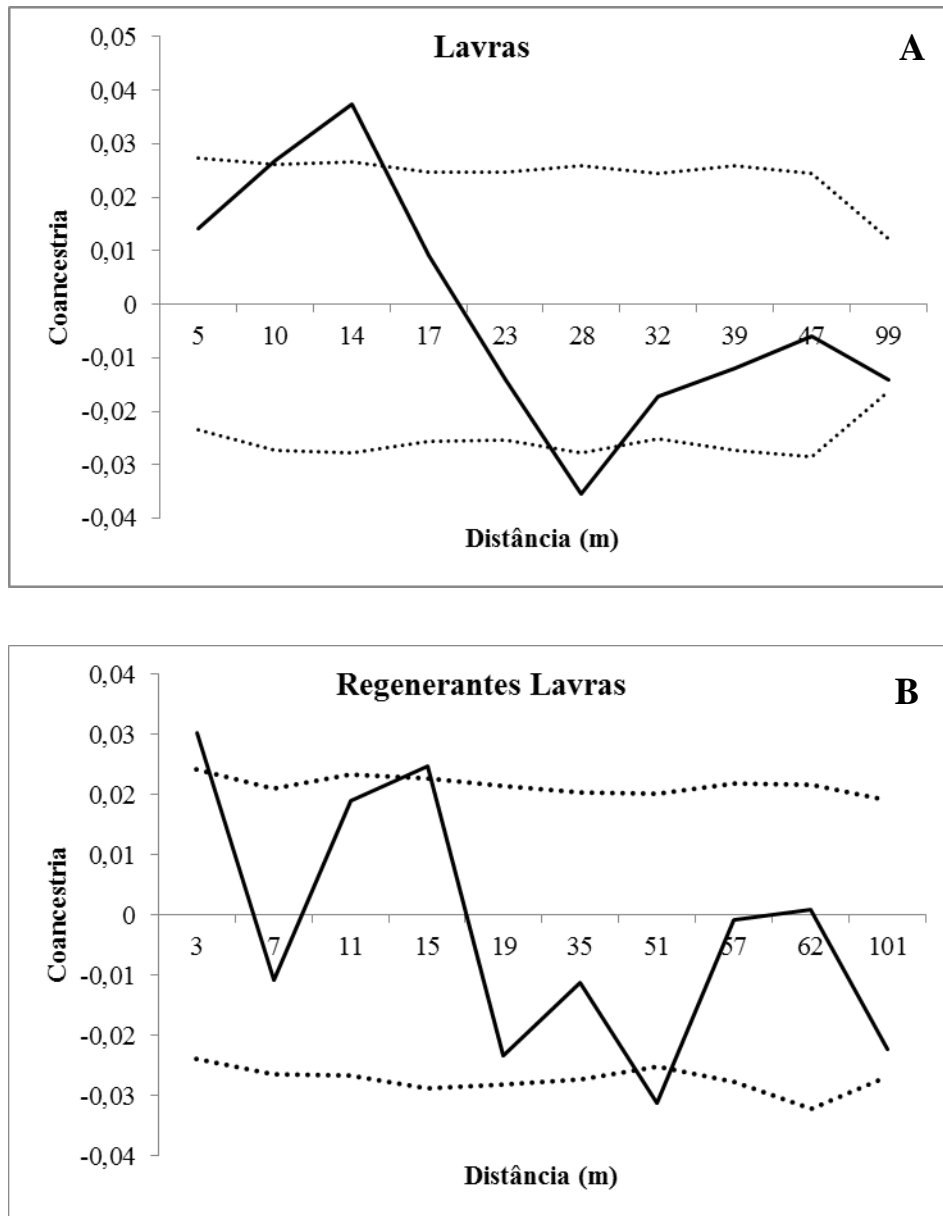


Figura 6. Autocorrelogramas de estrutura genética espacial dos grupos LAV (A) e RL (B) de *Calypttranthes clusiifolia* localizados na área Lavras. O eixo X indica distância em metros e o eixo Y refere-se à estimativa do coeficiente de coancestria médio (linha contínua). O intervalo de confiança a 95% está representado pelas linhas pontilhadas.

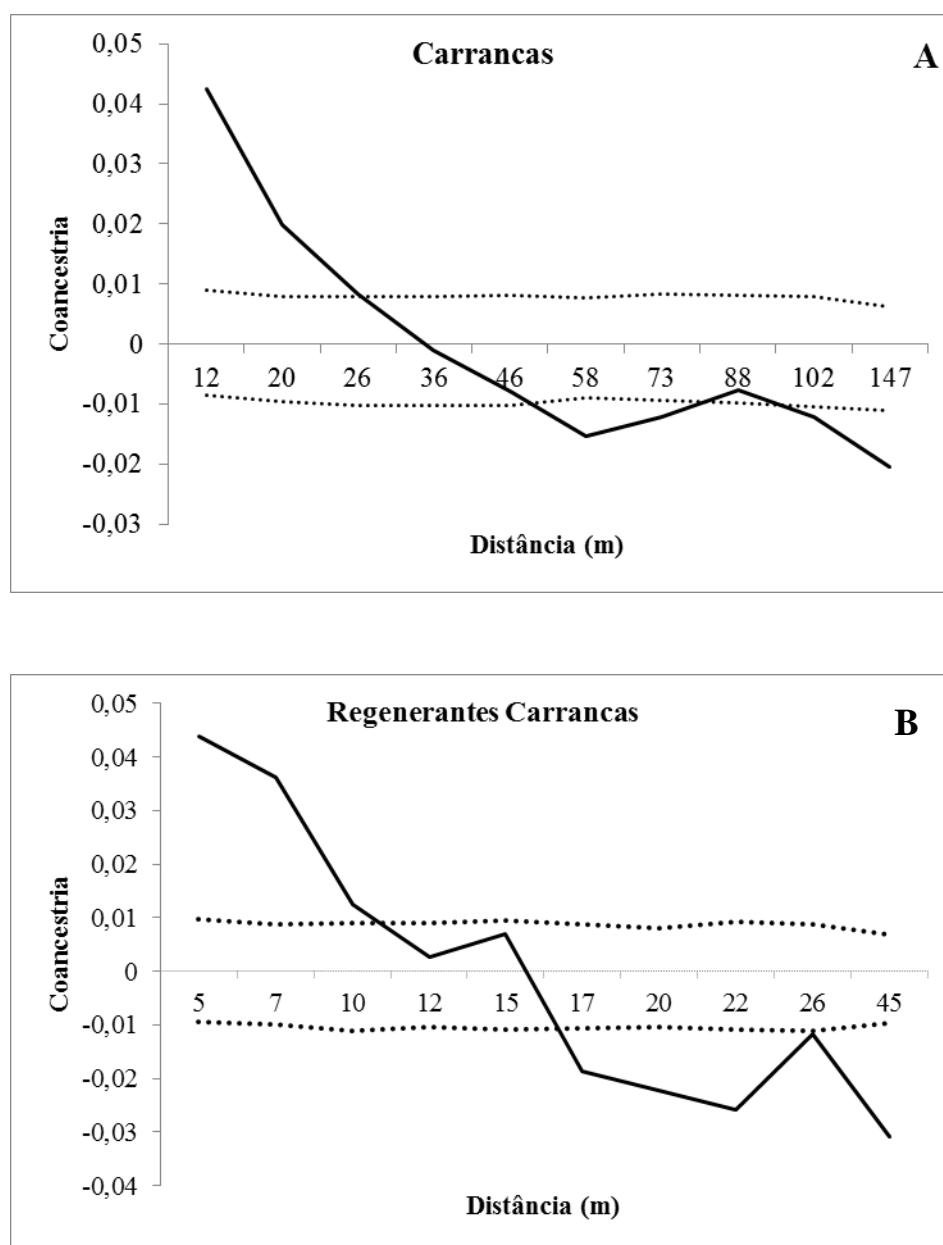


Figura 7. Autocorrelogramas de estrutura genética espacial dos grupos CAR (A) e RC (B) de *Calypttranthes clusiifolia* localizados na área Carrancas. O eixo X indica distância em metros e o eixo Y refere-se à estimativa do coeficiente de coancestria médio (linha contínua). O intervalo de confiança a 95% está representado pelas linhas pontilhadas.

4. DISCUSSÃO

Uma das premissas da conservação genética é de que a fragmentação de habitat, ao aumentar o isolamento geográfico entre as populações e diminuir o tamanho populacional, ocasionaria o aumento de diferenciação interpopulacional e a perda de variabilidade genética na população (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996). Para que estes efeitos nas populações possam ser detectados, Ouborg, Vergeer e Mix (2006) recomendaram que os parâmetros genéticos devessem ser avaliados em espécies consideradas de ocorrência comum em um habitat.

Os parâmetros genéticos obtidos para a espécie *Calypthranthes clusiifolia* foram baseados em um conjunto de quatro *loci* microssatélites. Como as estimativas de diversidade genética geralmente comparam as médias dos *loci* entre si, é preciso avaliar se dois *loci* que estejam próximos um ao outro no cromossomo segregam independentemente para que não sejam transmitidos nos regenerantes de maneira pareada, pois isso acarretaria no chamado desequilíbrio de ligação (SELKOE; TOONEN, 2006). Este desequilíbrio provoca viés nas análises, porém, para *C. clusiifolia*, os *loci* não apresentaram desequilíbrio de ligação e, por isso, foram considerados aptos a serem utilizados nas análises de diversidade do presente trabalho.

Os microssatélites são uma classe importante de marcadores moleculares bastante utilizados em estudos de diversidade genética. Porém, diversas vezes estes marcadores apresentam alelos nulos, ou seja, alelos que não amplificam durante a PCR e não serão detectados na genotipagem. A não amplificação pode ocorrer devido a mutações nas regiões flanqueadoras, onde os primers se ligam à sequência de DNA gerando resultados semelhantes aos de falhas ocorridas durante a amplificação do DNA (SELKOE; TOONEN, 2006). Como a presença dos alelos nulos pode resultar em distorções na proporção de homocigotos, elevando sua quantidade e, conseqüentemente, nas estimativas de diversidade

genética, é necessário que estes alelos sejam diferenciados das falhas na PCR (CHAPUIS; ESTOUP, 2007; GUICHOUX, 2011).

No presente trabalho, a presença de alelos nulos foi sugerida devido a um excesso de genótipos homozigotos na maioria das classes de tamanho dos alelos. Para que as análises posteriores não apresentassem resultados enviesados, os dados de genotipagem foram corrigidos, porém, como não houve diferença significativa, os dados originais foram utilizados para as estimativas de diversidade.

A variabilidade genética é reconhecida como a base para que uma espécie seja resiliente frente às ameaças como doenças, predadores e mudanças ambientais (AMOS; HARWOOD, 1998) e é expressa pelo valor de heterozigosidade média (H_e). A H_e esperada para o conjunto dos *loci* ($H_e=0,67$) foi considerada alta e semelhante ao valor encontrado por BARBOSA et al. (2015) para a espécie *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) onde $H_e= 0,679$ (11 *loci*).

- Diversidade e estrutura genética temporal nos grupos

Do ponto de vista de dinâmica temporal da diversidade genética, as estimativas de heterozigosidade esperada (H_e) foram mais altas nos grupos LAV e CAR quando comparadas aos grupos RL e RC, assim como nos demais parâmetros de diversidade avaliados, sugerindo uma tendência de redução da diversidade nestes grupos. Esta redução pode demonstrar que a fragmentação esteja influenciando na dinâmica temporal destas áreas. Do ponto de vista demográfico, o número de indivíduos regenerantes encontrados em cada transecto já se apresentou diferenciado, sendo que no fragmento antrópico, este número foi bem menor. Porém, esta diminuição poderia não afetar a

variabilidade genética nos regenerantes se o tamanho efetivo populacional (N_e) fosse o mesmo de uma população ideal ($N_e = N$).

Geralmente, é esperado que a fragmentação ao reduzir o número de indivíduos (N), provoque um gargalo populacional (bottleneck), ou seja, o tamanho efetivo é reduzido, resultando em mudanças nas frequências de alelos na população (CORNUET; LUIKART, 1996). Mas observando os valores de N_e calculados e os N de cada grupo, pode-se inferir que os grupos não sofreram uma redução muito intensa do seu tamanho efetivo. Este fato foi corroborado pelos testes de desequilíbrio de mutação e deriva que demonstraram que os grupos estudados não passaram por efeito gargalo recente.

O coeficiente de endogamia (F_{IS}) positivo pode ser reflexo do aumento da frequência de homozigotos em todas as populações explicando o desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) detectado. Porém, segundo Carvalho et al. (2010), o número de indivíduos homozigotos poderia também ser resultado do indício de alelos nulos, já que em indivíduos heterozigotos, quando a presença de alelos nulos é detectada, apenas um dos alelos seria amplificado.

Em relação à diferença entre os valores de F_{IS} no fragmento antrópico, o aumento do coeficiente de endogamia em RL, pode estar refletindo a diminuição de polinizadores e dispersores naquela paisagem, já que, a matriz de entorno tem em seu histórico, modificações do uso da terra entre pastagens e o cultivo agrícola. A área Carrancas foi a que apresentou os maiores F_{IS} e, uma possível explicação a este fato é que há um isolamento natural da área em relação a outros fragmentos, ou mesmo, devido ao tipo de formação do fragmento natural, o estabelecimento de *C. clusiifolia* poderia ter ocorrido a partir de poucos indivíduos. Assim, os possíveis indivíduos reprodutivos podem ter algum grau de parentesco (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996). Investigações acerca da biologia reprodutiva de *C. clusiifolia* poderão ajudar a elucidar estes aspectos.

A estrutura genética das populações arbóreas é definida como a distribuição não aleatória dos genótipos no espaço e tempo, que é resultante da interação entre heterogeneidade ambiental e processos como a migração, a dispersão entre outros (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Nybom (2004), revisando estudos com diferentes marcadores moleculares, observou que espécies perenes e de fecundação cruzada apresentam maior variabilidade genética dentro de suas populações. Este resultado também foi obtido para *C. clusiifolia*, onde a maior variabilidade foi encontrada dentro dos grupos.

Brandão, Vieira e Carvalho (2011) estudando a espécie *Myrcia splendens* (Myrtaceae) no sistema corredor-fragmento da área Lavras (mesma área deste trabalho) relataram que a maior proporção de variabilidade genética está dentro das populações (96,5% nos fragmentos), o que pode ser explicado pela proximidade entre eles, além da existência de corredores que permitem a dispersão de pólen e sementes. Na mesma área de Lavras, valores encontrados para *Protium spruceanum* (Burseraceae) foram de encontro ao esperado, 97% da variabilidade se encontra dentro das populações (VIEIRA; CARVALHO, 2008).

A diferenciação genética (D_{est}), avaliada sob a ótica temporal, foi baixa entre os grupos CAR e RC, bem como entre LAV e RL indicando a existência de fluxo gênico nos grupos ($Nm = 13$) tanto entre LAV e RL como em CAR e RC. Já a diferenciação entre os grupos de regenerantes RL e RC foi grande ($D_{est} = 0,248$) demonstrando que a troca de alelos entre estes grupos está baixa ($Nm = 1,77$). Essa diferenciação pode ser efeito do processo de fragmentação já que a diferenciação entre CAR e LAV foi considerada moderada ($Nm = 3,47$).

- Estrutura genética espacial

A EGE foi detectada para os quatro grupos, ou seja, foi detectada a distribuição não aleatória dos genótipos nas áreas estudadas. Esse resultado

sugere que indivíduos localizados mais próximos são parentes. De fato, nos grupos CAR e RC, os valores de coancestria estão próximos ao que é esperado para indivíduos primos de 1º grau ($\theta_{XY} = 0,0625$).

Ao comparar os dados de estrutura (MOREL et al., 2014) e dinâmica populacional (SANTOS, 2014) para estes mesmos indivíduos de *C. clusiifolia*, a espécie apresentou uma distribuição agregada na área Carrancas e também na área Lavras. Em relação às classes de altura, os indivíduos maiores, na área Carrancas, apresentaram preferência pelos ambientes próximos à borda enquanto que, as menores classes estiveram agregadas mais no interior, próximas ao curso d'água (MOREL et al., 2014).

Esses indivíduos por estarem mais próximos podem cruzar entre si e com isso aumentar os níveis de parentesco no fragmento estudado. Como foram detectados neste estudo, os maiores valores de F_{IS} foram registrados para os grupos da área Carrancas.

Uma possível explicação do menor valor de coancestria ter sido encontrado para o grupo LAV é de que o fragmento pode ter recebido em algum momento, um maior fluxo de pólen e sementes provenientes de fragmentos que são encontrados próximos a esta área.

Semelhante ao presente trabalho, Moura et al. (2009) ao comparar a EGE em populações de lobeira (*Solanum* spp.) em fragmentos naturais e antropizados, encontraram estruturação espacial em todas as áreas e ressaltaram que a EGE parece ser um fato comum à espécie.

Os valores da estatística S_p obtidos para os grupos foram maiores do que os observados para espécies de fecundação cruzada e de sementes dispersas por animais ($S_p = 0,0126; 0,0088$, respectivamente) (VEKEMANS; HARDY, 2004) como é o caso de *C. clusiifolia* que, provavelmente, apresenta fecundação cruzada e tem suas sementes dispersas por aves. Porém, estudos que abordem

melhor os mecanismos de dispersão e polinização para *C. clusiifolia* poderão auxiliar nos padrões encontrados neste estudo.

5. CONCLUSÃO

A dinâmica genética temporal indicou influência do processo de fragmentação nos valores de diversidade genética, os quais se apresentaram menores nos grupos regenerantes. Além disso, houve uma maior diferenciação genética entre estes mesmos grupos demonstrando que o fluxo gênico entre RL e RC foi baixo. Porém, comparando os grupos do fragmento natural entre si, bem como os grupos do fragmento antrópico entre si, a diferenciação genética foi baixa.

Também foram detectados maiores níveis de endogamia na área de fragmento natural quando comparada ao fragmento antrópico. Essa endogamia pode ser o reflexo de um maior cruzamento entre aparentados no fragmento natural. De fato, a distribuição não aleatória dos indivíduos nos quatro grupos, ou seja, a estrutura genética espacial de *Calypttranthes clusiifolia* detectada não foi exclusiva ao fragmento antrópico.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 24, p. 5177-5188, Dec. 2008.

AMOS, W.; HARWOOD, J. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 353, n. 1366, p. 177-186, Feb. 1998.

BARBOSA, A.C.O. et al. Range-wide genetic differentiation of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) populations in Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 59, p. 288-296, Apr. 2015.

BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 957-964, set./out. 2011.

CARVALHO, A.C.M. et al. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 599-606, dez. 2010.

CORNUET J.M.; LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Londres, v. 144, p. 2001-2014, Dec.1996.

CHAPUIS, M.P.; ESTOUP, A. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, Chigaco, v. 24, n. 3, p. 621-631, March 1, 2007. Disponível em: <
<http://mbe.oxfordjournals.org/content/24/3/621.abstract> >.

DEMPSTER, A.P.; LAIRD, N.M.; RUBIN, D.B. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B**, London, v. 39, p.1-38, 1977.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **ARLEQUIN: a software for population data analysis**. Version 3.1. Geneva: University of Geneva, 2005. Disponível em: <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>>. Acesso em: 15 nov. 2010

GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3.2. 2002. Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>

GUICHOUX, E. et al. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 591-611, Jul. 2011.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, Washington, v. 48, n. 36, p. 372, Jun. 1992.

HARDY, O.J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 618-620, Dec. 2002.

HEDRICK, P. W. A Standardized Genetic Differentiation Measure. **Evolution**, New York, v. 59, n. 8, p. 1633-1638, Aug. 2005.

HONNAY, O. et al. Forest fragmentation effects on patch occupancy and population viability of herbaceous plant species. **New Phytologist**, London, v. 166, p. 723-736, Jun. 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/manuais_tecnicos/manual_tecnico_vegetacao_brasileira.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2015.

JOST, L. GST and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, p. 4015–4026, Sept. 2008.

KRAMER, A. T. et al. The Paradox of Forest Fragmentation Genetics. **Conservation Biology**, Malden, v. 22, n. 4, p. 878-885, Dec. 2008.

LOISELLE, B. A. et al. Spatial genetic structure of a tropical understorey shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Baltimore, v.82, p. 1420–1425, Nov. 1995.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic-structure in plant-populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, Nov. 1984.

MOREL, J.D. et al. Population structure of *Calyptranthes clusiifolia* O. Berg in two patches in the southern Minas Gerais state. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n.5, p.924-937, Oct. 2014.

MOURA, T.M. et al. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimados por meio de locos microssatélites. **Scientia forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 82, p. 143-150, Jun. 2009.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v.13, n.5, p.1143-1155, May. 2004.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; SCOLFORO, J. R.; MELLO, J. M. Composição florística e estrutura comunitária de um remanescente de floresta semidecídua montana em Lavras (MG). **Revista Brasileira de Botânica, São Paulo**, v. 17, n. 2, p. 159-174, Dec. 1994.

OUBORG, N.J.; VERGEER, P.; MIX, C. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 94, p. 1233–1248, Nov. 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 288 – 295, Mar. 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, p. 2537-2539, Jul. 2012.

PIOTTI, A. The genetic consequences of habitat fragmentation: the case of forests. **iForest**, v. 2, p. 75-76, Jun. 2009.

QIU, Y. et al. Spatial and temporal population genetic variation and structure of *Nothotsuga longibracteata* (Pinaceae), a relic conifer species endemic to subtropical China. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 4, p. 598-607, Nov. 2013.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, New York, v. 86, p.248-249, 1995.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 8, p. 103-106, 2008.

SANTOS, P.F. **Ecologia comportamental de *Calyptranthes clusiifolia* O. Berg. (Myrtaceae) em uma área naturalmente fragmentada de Floresta Estacional Semidecidual Altomontana situada na serra de Carrancas, sul de Minas Gerais.** 2014. 46p. Dissertação (Mestrado Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 615-629, Dec. 2006.

VENCOVSKY, R. Biometrical approaches for molecular markers: estimation of effective population size. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY, p. 12-22, 1997, Piracicaba. Proceedings...Piracicaba: ESALQ/USP, 1997.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 921-935, Apr. 2004.

VIEIRA, F.A.; CARVALHO, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 17, p. 2305-2321, Sept. 2008.

WEIR, B. S. Genetic Data Analysis II. Sinauer, Sunderland, Mass. 1996.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v 11, p. 413-418, Oct. 1996.