



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

**Diversidade genética da espécie dioica *Myrsine coriacea* (Primulaceae)
da Floresta Atlântica**

**Alegre, ES
Fevereiro de 2017**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

Diversidade genética da espécie dioica *Myrsine coriacea* (Primulaceae)
da Floresta Atlântica

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como partes das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de mestre em Genética e Melhoramento.

Discente: Roberta Pena da Paschoa
Orientadora: Prof. Dra. Tatiana Tavares Carrijo
Coorientadora: Profa. Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira

Alegre, ES
Fevereiro de 2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

P279d Paschoa, Roberta Pena da, 1992-
Diversidade genética da espécie dioica *Myrsinecoriacea* (Primulaceae)
da Floresta Atlântica/Roberta Pena da Paschoa. – 2017.
38f. : il.

Orientadora: Tatiana Tavares Carrijo.
Coorientadora: Marcia Flores da Silva Ferreira.
Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias.

1. Capororoca. 2. Florestas – Conservação. 3. Marcador molecular
ISSR. 4. Reflorestamento. I. Carrijo, Tatiana Tavares. II. Ferreira, Marcia
Flores da Silva. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 575:631


DIVERSIDADE GENÉTICA DA ESPÉCIE DIOICA *Myrsine coriacea*
(PRIMULACEAE) DA FLORESTA ATLÂNTICA

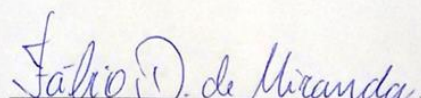
ROBERTA PENA DA PASCHOA

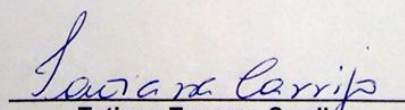
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como partes das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada 24 de Fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA


Mário Luís Garbin
Universidade Vila Velha


Fábio Demolinari de Miranda
Universidade Federal do
Espírito Santo


Tatiana Tavares Carrijo
Universidade Federal do
Espírito Santo
Orientadora

AGRADECIMENTOS

GRATIDÃO, essa palavra resume tudo o que sinto nesse momento. São tantos momentos vividos nesses dois anos, momentos maravilhosos, outros nem tanto (risos). Em todos esses momentos alguém estava presente me apoiando, incentivando, me fazendo rir, ou simplesmente presente. Tantas pessoas para agradecer, que palavras jamais definirão toda gratidão que sinto.

Agradeço primeiramente a Deus, que é meu melhor amigo e que caminha comigo todo o tempo.

Aos meus pais, Maria Lúcia Pena da Paschoa e José Roberto Venâncio da Paschoa, porque acreditaram e investiram em mim me dando apoio, compreensão, ajuda, carinho, atenção e dedicação ao longo deste percurso.

Aos meus irmãos, Rômulo Pena da Paschoa e Rafael Pena da Paschoa, pelo carinho e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus avós, Angelina Maria da Paschoa, José Venâncio da Paschoa e Erotildes da Silva Pena que sempre me deram apoio, conselhos e um colo nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas, cumplicidade compartilhada e por muitas vezes terem sido minha válvula de escape.

Aos laboratórios de Botânica e de Genética e Melhoramento Vegetal, por todo apoio durante a pesquisa. Obrigada por todas as vezes que me ajudaram, sem vocês nada disso seria possível.

À CAPES, pela concessão da bolsa e a FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo) pelo financiamento da pesquisa a qual esse trabalho está vinculado;

Ao programa de Genética e Melhoramento da UFES e meus professores, por todo ensinamento passado. Em especial ao professor Fábio Demolinari de Miranda, com quem muito aprendi durante esses dois anos.

À minha orientadora, Tatiana Tavares Carrijo, com quem muito aprendi e muito contribuiu para meu crescimento profissional. Ao professor Mário Luís Garbin que muito ajudou na construção desse estudo. A minha coorientadora Marcia Flores da Silva Ferreira por todo apoio na realização deste trabalho;

A Deus toda honra, glória e louvor!

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	6
MATERIAL E MÉTODOS	9
Espécie estudada e amostragem das populações.....	9
Extração do DNA	12
Seleção de <i>primers</i> , otimização da PCR e amplificação dos marcadores ISSR.....	13
Análise dos dados	14
RESULTADOS	16
Avaliação da seleção de <i>primers</i>	16
Diversidade genética, fluxo gênico e estrutura populacional	18
Comparações multivariadas.....	23
DISCUSSÃO	28
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

RESUMO

Myrsine coriacea é uma espécie da família Primulaceae representada por árvores ou arbustos dioicos, encontrada em todas as fitofisionomias da Floresta Atlântica. Os indivíduos de *M. coriacea* em ambientes naturais apresentam um padrão de distribuição espacial agregado, formando populações isoladas, geralmente estabelecidas em áreas descampadas ou em processo de regeneração. A influência deste isolamento sobre a diversidade genética em populações naturais da espécie é desconhecida. Ainda assim, *M. coriacea* é utilizada em programas de reflorestamento no Brasil, dado que apresenta elevada capacidade de produção de frutos atrativos à avifauna, potencializando o processo chuva de sementes. Além disso, o sombreamento da copa auxilia na supressão de gramíneas, facilitando o estabelecimento de plântulas de outras espécies de Angiospermas. A obtenção de sementes para este fim, no entanto, tem sido realizada sem considerar a genética das matrizes. A diversidade genética corresponde ao número de alelos por loco e como esses alelos estão distribuídos na população. Sua mensuração dentro e entre as populações pode fornecer informações importantes para a conservação e manejo dos recursos naturais. O objetivo deste estudo foi mensurar a diversidade genética intrapopulacional, interpopulacional e entre indivíduos de sexo masculino e feminino em populações naturais de *M. coriacea* em áreas de Floresta Atlântica. Para tanto, foram mensurados ou estimados: 1. a magnitude e a distribuição da variabilidade genética dentro das populações; 2. a dissimilaridade genética entre cada par de indivíduos dentro das populações; 3. O fluxo gênico e o grau de diferenciação entre as populações; e 4. a estruturação espacial da variabilidade genética. Os resultados encontrados indicam altos níveis de polimorfismo e de diversidade genética em *M. coriacea*. A maior diversidade genética dentro das populações em comparação a diferenciação genética moderada entre elas, indica que há fluxo gênico interpopulacional, apesar da distância e do isolamento aos quais as populações estão submetidas e tamanho das manchas formadas. As análises multivariadas detectaram diferenças significativas entre as populações, mas não entre os indivíduos de sexos distintos, não havendo interação significativa entre os fatores sexo e localidade. As análises de diversidade genética realizadas para indivíduos masculinos e femininos separadamente também não indicaram diferenças genéticas entre os morfos sexuais. Os resultados sugerem que as populações estudadas conservam diversidade genética intrapopulacional apesar do isolamento e, devido a alta diversidade genética intrapopulacional, possuem potencial para marcação de matrizes com finalidade de coleta de sementes para fins de reflorestamento.

Palavras-chave: capororoca, conservação, ISSR, Myrsinaceae, *Rapanea*, reflorestamento.

ABSTRACT

Myrsine coriacea is a species of the family Primulaceae represented by dioic trees or shrubs, found in all the phytophysiognomies of the Atlantic Forest. The individuals of *M. coriacea* in natural environments present an aggregated spatial distribution pattern, forming isolated populations, usually established in open areas or in the process of regeneration. The influence of this isolation on genetic diversity in natural populations of the species is unknown. Nevertheless, *M. coriacea* is used in reforestation programs in Brasil, since it has a high production capacity of attractive fruits to the avifauna, potentiating the seed rainfall process. In addition, canopy shading helps to suppress grasses, facilitating the establishment of seedlings of other species of Angiosperms. Obtaining seeds for this purpose, however, has been performed without considering the genetics of the matrices. Genetic diversity corresponds to the number of alleles per locus and how these alleles are distributed in the population. Their measurement in and out as populations can provide important information for conservation and management of natural resources. The objective of this study was to measure an intrapopulational, interpopulational genetic diversity and between male and female individuals in natural populations of *M. coriacea* in Atlantic Forest areas. Therefore, we estimated: 1. a magnitude and a distribution of genetic variation within populations; 2. genetic dissimilarity between each pair of individuals within populations; 3. The generic flow and degree of differentiation between populations; And 4. spatial structuring of genetic variability. The results indicate high levels of polymorphism and genetic diversity in *M. coriacea*. The greater genetic diversity within populations compared to moderate genetic differentiation among them, indicates that there is an interpopulation gene flow, despite the distance and isolation to which the populations are subjected and. Multivariate analyzes detected significant differences between populations, but not between individuals of different sexes, with no significant interaction between the sex and locality factors. As analyzes of genetic diversity carried out for males and females also do not indicate genetic differences between the sexual morphs. The results suggest that the studied populations conserve intrapopulational genetic diversity despite the isolation and, due to the high intrapopulational genetic diversity, with potential for marking of matrices for the purpose of collecting seeds for reforestation purposes.

Key-words: capororoca, conservation, ISSR, Myrsianaceae, *Rapanea*, reforestation.

INTRODUÇÃO

Myrsine coriacea (Sw.) R. Br. ex Roem. &Schult. (também conhecida pelo sinônimo *Rapanea ferruginea* (Ruiz &Pav.) Mez), pertence a família Primulaceae (s. APG IV 2016), que se destaca pela promoção de diferentes serviços ecossistêmicos. Seus representantes são árvores ou arbustos dioicos (Freitas & Kinoshita 2015), que ocorrem nas Américas Central e do Sul (Tropicos). O Cerrado e a Floresta Atlântica são os biomas de ocorrência natural desta espécie no Brasil (BFG 2015), sendo que neste segundo bioma a espécie pode ser encontrada em praticamente todas as fitofisionomias incluindo ambientes contrastantes como Restingas e Campos de Altitude (BFG 2015; Freitas & Kinoshita 2015). Populações espacialmente agregadas são frequentemente encontradas em áreas descampadas (Freitas & Carrijo 2008) que passaram por distúrbio (como pastos abandonados) ou não (afloramentos rochosos). Apresenta características interessantes para fins de reflorestamento, como a elevada capacidade de produção de frutos atrativos à avifauna (Pascotto 2007; Jesus e Monteiro-Filho 2007), que também potencializa o processo chuva de sementes (Begnini et al. 2013). O sombreamento da copa auxilia na supressão de gramíneas, facilitando o estabelecimento de plântulas de outras espécies de Angiospermas (Silveira et al. 2013). Esses atributos tornaram *M. coriacea* uma das espécies mais utilizadas em programas de reflorestamento no Brasil. A obtenção de sementes para este fim, no entanto, é realizada sem considerar aspectos relacionados à variabilidade genética das populações naturais. Essa lacuna de conhecimento compromete o entendimento dos processos ecológicos associados a essa espécie de interesse florestal.

A diversidade genética de uma espécie corresponde a qualquer medida que quantifica a magnitude da variação genética dentro de uma população (Hughes et al. 2008). A redução da habilidade das populações se adaptarem às mudanças ambientais é um dos vários efeitos de sua perda (Reed e Frankham 2003), podendo acarretar no declínio ou na extinção de espécies ou de linhagens. No cenário atual de mudanças climáticas globais e de transformações dos sistemas naturais devido a atividade humana, mensurar os níveis de

diversidade genética de populações é essencial para fornecer informações que possibilitem a tomada de decisões quanto à conservação e uso dos recursos naturais. O avanço no desenvolvimento de marcadores moleculares mais eficientes e menos custosos tem possibilitado um enorme avanço do conhecimento sobre a diversidade genética de populações naturais na Floresta Atlântica (Buzatti et al. 2012; Silva et al. 2013; Melo et al. 2014; Vianna 2015), um dos hotspots de biodiversidade (Myers et al. 2000) do Brasil. Ainda assim, os dados de distribuição da biodiversidade dentro dos hotspots são escassos para a conservação eficaz das espécies diante das rápidas mudanças ambientais (Carnaval et al. 2009), e não incorporam a informação molecular.

Marcadores moleculares neutros têm se mostrado ferramentas fundamentais para inferir sobre padrões de dispersão genética (Souza et al. 2013; Gois et al. 2014; Gonçalves et al. 2014; Melo et al. 2014; Hoeltgebaum et al. 2015). O desenvolvimento da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) abriu portas para o surgimento de diversas classes de marcadores moleculares, como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*), entre outros (Souza, 2015). Dentre as várias vantagens atribuídas aos marcadores ISSR, destaca-se a característica de serem altamente efetivos para a detecção de polimorfismos entre taxa, genótipos ou acessos. Outras vantagens associadas ao uso dos ISSR em comparação a outros marcadores moleculares desenvolvidos para estudos populacionais (e.g., como SSR, *Simple Sequence Repeats*), estão associadas a sua capacidade de detectar polimorfismos sem qualquer conhecimento prévio da sequência de DNA do organismo estudado (Kumar et al. 2006). Os ISSR empregam iniciadores mais longos que permitem temperaturas mais rigorosas de anelamento, o que aumenta a reprodutibilidade das análises (Jones et al. 1997). Por essas características, estes marcadores tem sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética com foco em populações naturais de espécies ameaçadas

(Ansari et al. 2012; Yin et al. 2014; Noroozisharaf et al. 2015) ou com algum interesse econômico (Gonçalves et al. 2014; Moraes et al. 2015).

O sistema sexual figura entre uma das características biológicas mais relevantes para a determinação da variação genética em populações de espécies vegetais. Espécies dioicas ou auto-incompatíveis, por exemplo, geralmente apresentam diversidade genética intrapopulacional maior em comparação a espécies hermafroditas auto-compatíveis (Charlesworth e Charlesworth 1978; Thomson e Barret 1981). Isto pode ser vantajoso, considerando que a variação genética de uma população pode permitir respostas relativamente rápidas para um desafio ambiental. Por outro lado, espécies dioicas ou auto-incompatíveis que ocorrem em pequenos fragmentos podem estar mais inclinadas a extinção local em comparação à espécies hermafroditas, porque a razão sexual pode pender para um dos sexos nestes ambientes (Bawa 2004). Somado a isso, uma grande proporção das espécies dioicas apresenta frutos carnosos dispersos por animais (Bawa 1980), e vertebrados frugívoros podem estar ausentes em pequenos fragmentos (Bawa 2004). Considerando que grande parte das espécies arbóreas tropicais são auto-incompatíveis ou dioicas (Bawa 1974, 1975), a informação sobre os padrões de diversidade genética nestes organismos são fundamentais para o estabelecimento de estratégias de conservação, e elaboração do arcabouço teórico necessário para a proposição de generalizações para estas espécies. No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade genética de espécies arbóreas da família Primulaceae. Apenas uma espécie de mangue (*Aegiceras corniculatum*) foi estudada com este enfoque até o momento (Ge e Sun 1999).

O objetivo deste estudo foi mensurar a diversidade genética intrapopulacional, interpopulacional e entre indivíduos de sexo masculino e feminino em populações naturais de *Myrsine coriacea* (Sw.) R.Br. ex Roem. & Schult. em áreas de Floresta Atlântica. Hipotetisa-se que a diversidade genética intrapopulacional é maior do que a diversidade genética interpopulacional, padrão esperado para espécies de polinização cruzada obrigatória. Por esta mesma razão é esperada pouca divergência entre indivíduos

masculinos e femininos, dentro de cada população. Para tanto, foram mensurados ou estimados: 1. a magnitude e a distribuição da variabilidade genética dentro das populações, considerando todos os indivíduos de cada localidade estudada e os indivíduos masculinos e femininos, separadamente; 2. a dissimilaridade genética entre cada par de indivíduos dentro das populações; 3. O fluxo gênico e o grau de diferenciação entre as populações; e 4. A estruturação espacial da variabilidade genética. Os resultados gerados permitirão avaliar a necessidade de estratégias para a conservação de suas populações naturais, assim como fornecerão as bases genéticas necessárias ao manejo da espécie para fins de reflorestamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécie estudada e amostragem das populações

Os indivíduos de *Myrsine coriacea* podem se apresentar como arbustos a árvores de 1,5-15 m altura, possuem ramos caracteristicamente candelabriformes, folhas alternas semestípulas, cuja lâmina foliar apresenta formato geralmente lanceolado, variando em tamanho. As flores são pentâmeras, e desenvolvem-se como inflorescências glomeriformes e ramifloras (Freitas & Carrijo 2008; Freitas et al. 2009). A amostragem deste estudo incluiu 249 indivíduos distribuídos em 10 populações naturais de *Myrsine coriacea*, ocorrentes em diferentes municípios da região sul do estado do Espírito Santo (Figura 1), região sudeste do Brasil. As populações estudadas foram identificadas pela numeração de 1 a 10 (Tabela 1). *Myrsine coriacea* é uma espécie precursora na ocupação de áreas descampadas. Nesses locais, os indivíduos formam populações que apresentam distribuição espacial local caracteristicamente agregada formando manchas isoladas geograficamente. Neste caso, cada população de cada um dos locais estudados (diferentes municípios) representa uma mancha. Essas populações diferem, basicamente, pelo tamanho da mancha.

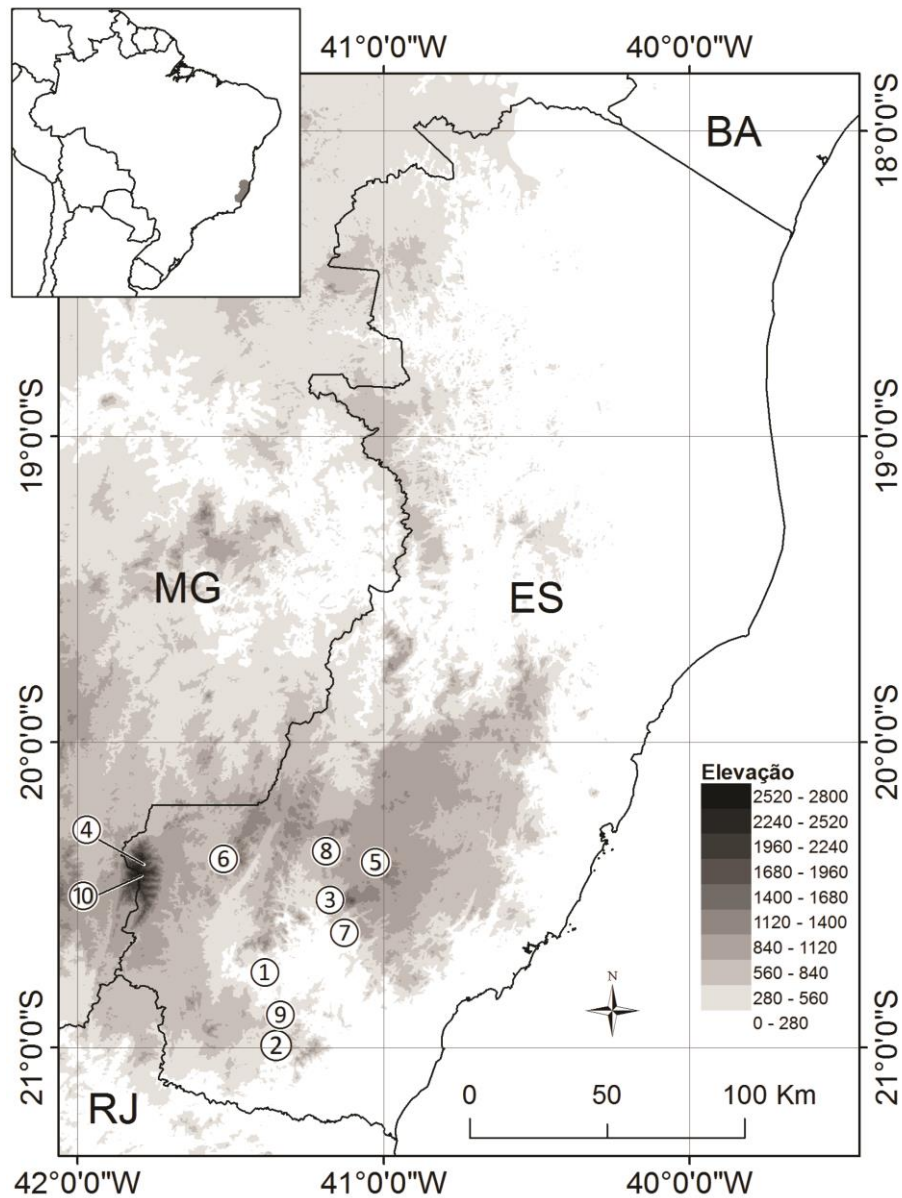


Figura 1. Localização geográfica das dez populações naturais de *Myrsine coriacea* estudadas. Localidade 1 – Município de Alegre, localidade Caveira D’Anta; Localidade 2 – Município de Mimoso do Sul, localidade Pedra dos Pontões; Localidade 3 – Município de Castelo, localidade Parque Estadual Forno Grande; Localidade 4- Município de Dolores do Rio Preto, localidade Macieira no Parque Nacional do Caparaó; Localidade 5- Município de Domingos Martins, localidade Parque Estadual Pedra Azul; Localidade 6- Município de Iúna, localidade Serra do Valentim; Localidade 7- Município de Vargem Alta, localidade propriedade rural; Localidade 8 – Município de Venda Nova do Imigrante, localidade Fazenda Experimental do Incaper e em uma propriedade rural; Localidade 9 – Município de Muqui, localidade propriedade rural; Localidade 10- Município de Dolores do Rio Preto, localidade Casa Queimada no Parque Nacional do Caparaó.

Tabela 1. Localidades das dez populações naturais estudadas (a localidade é designada pelo nome do município) de *Myrsine coricea*, informando as siglas utilizadas para identificar cada população, as coordenadas geográficas e a elevação média de cada localidade. 1 – Alegre; 2 – Mimoso do Sul; 3 – Castelo; 4 – Dores do Rio Preto (Macieira); 5 – Domingos Martins; 6 – Iúna; 7 – Vargem Alta; 8 – Venda Nova do Imigrante; 9 – Muqui; 10 – Dores do Rio Preto (Casa Queimada).

Código da população	Localidade da população (Município)	Latitude	Longitude	Altitude (m.s.m.)
1	Município de Alegre	20°45'21"S	41°23'72"W	752 823
2	Município de Mimoso do Sul	20°59'35"S	41°21'08"W	917 977
3	Município de Castelo	20°30'59"S	41°05'03"W	1158 1117
4	Município de Dores do Rio Preto (Macieira)	20°26'53"S	41°49'57"W	1774 1868
5	Município de Domingos Martins	20°23'38"S	41°01'36"W	1302 1270
6	Município de Iúna	20°22' 59"S	41°31'23"W	1093 1109
7	Município de Vargem Alta	20°37' 33"S	41°07'37"W	863 872
8	Município de Venda Nova	20°21'28"S	41°11'11"W	851 867
9	Município de Muqui	20°53'40S	41°20'12"W	639 646
10	Município de Dores do Rio Preto (Casa queimada)	20°27'27"S	41°48'38"W	2532

As expedições para coleta do material biológico foram realizadas entre agosto e dezembro de 2015, durante o período de floração da espécie, para distinção dos indivíduos femininos de masculinos pelas flores. Os seguintes critérios foram adotados para a coleta do material para o estudo molecular: 1. incluir apenas indivíduos adultos e em fase reprodutiva; 2. incluir apenas indivíduos masculinos e femininos compatíveis em altura e diâmetro do caule, respeitando as particularidades de cada região; 3. indivíduos representativos de toda a mancha de ocupação da espécie por localidade. As amostras foliares coletadas a campo foram armazenadas individualmente em embalagem de papel lacrados, com sílica gel. Em laboratório, as amostras foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas por pelo

menos 24 horas em Freezer -30°C. Após este período, as amostras foram liofilizadas durante 48h e armazenadas em caixas com sílica gel.

Extração do DNA

O DNA genômico total foi isolado e purificado usando o método de extração de Doyle & Doyle (1990) modificado. As folhas foram maceradas utilizando *MagNa Lyser Instrument - Roche Life Science*. Aproximadamente 200 mg do pó obtido foi transferido para microtubos de 2mL previamente identificados. Em cada amostra foi utilizado 650 µL de tampão de extração com a seguinte constituição: 2% v/v de CTAB, 1,4 mol/L de NaCl₂, 20 mmol/L de EDTA, 100 mmol/L de Tris-HCl a pH 8,0; 2% p/v de Polivinilpirrolidona sólida e 0,2% v/v de β-mercaptoetanol. A mistura foi homogeneizada no vórtex por 20 segundos e incubada em banho seco com agitação a 65°C por 45 minutos. Posteriormente foi esfriada a temperatura ambiente e realizadas duas lavagens com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) pelo o seguinte procedimento: adicionado um volume de 600 µL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) os microtubos foram suavemente homogeneizados e microcentrifugados por 10 minutos a 12000 rpm, em seguida, a fase superior foi transferida para outros tubos. Foi adicionado um volume igual ao sobrenadante de isopropanol gelado e acetato de amônio (C₂H₇NO₂) na proporção 1:3. Os microtubos foram suavemente agitados e incubados a - 20 °C por uma noite. Posteriormente todas as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12000 rpm, e o sobrenadante removido, o precipitado foi lavado duas vezes com álcool 70% e microcentrifugado por 5 minutos a 14000 rpm, o pellet foi seco em banho seco a 65° por 15 minutos. Este precipitado foi ressuspensão em 100 µL de TE (10 mmol/L de Tris-HCl, 1mmol/L de EDTA a pH 8,0), contendo RNase na concentração final de 50 µg/mL e incubado em banho seco a 37 °C por 30 minutos. A partir da extração, foi realizada a quantificação de DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8% para observação do nível de oxidação presente no DNA, e quantificação da concentração e pureza no espectrofotômetro NanoDrop 2000 *Thermo Scientific*. A partir da quantificação as amostras de DNA foram diluídas a concentração de 10 ng/ µL.

Seleção de *primers*, otimização da PCR e amplificação dos marcadores ISSR

Foi realizado um screening com 32 primers ISSR obtidos da British Columbia University, Vancouver, Canadá, sete *primers* foram selecionados de acordo com o maior número de fragmentos polimórficos apresentados (Tabela 2). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada em um volume total de 15µL, contendo 7,5 mM de Mix de enzimas para PCR (Thermo scientific), 1 µL de primer a uma concentração de 5µM, 0,2 unidade de Taq polimerase e 30ng de DNA. As reações foram realizadas nas seguintes condições: fase de desnaturação, 5 minutos a 94°C, seguidos de 40 ciclos na fase de anelamento constituídos por três etapas: a) 1 minuto a 94°C, b) 1 minuto a 50°C e c) 1 minuto a 72°C, com uma fase final de extensão, 2 minutos a 72°C. A reação foi corada e preparada para posterior visualização com 1µL de GelRed™, já diluído, e 3µl do corante T4. Os fragmentos obtidos nas reações de PCR foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,2% e tampão de corrida TBE (tris-base, ácido bórico e EDTA), a 90 volts por aproximadamente 2 horas e meia. Ao término da corrida os géis foram fotografados sob luz ultravioleta utilizando o Sistema de Fotodocumentação L PIX HE da Loccus Biotecnologia.

Tabela 2. Sete *primers* ISSR selecionados para amplificação dos fragmentos de DNA das dez populações naturais estudadas de *Myrsine coriacea*. NTB - Total de bandas (incluindo todas as populações) amplificadas por *primer* ISSR; PBP - porcentagem de bandas polimórficas; PM - peso molecular máximo e mínimo dos fragmentos obtidos; PIC - conteúdo de informação polimórfica (Roldan-Ruiz et al. 2000) estabelecido com base em marcador de 1Kb.

Primers	Sequências (5'-3')	NTB*	PBP	PM (máx.min)	PIC
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	4	100%	750 - 300	0,317151
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	5(1)	80%	1000 - 350	0,282144
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	5(1)	80%	1000 - 400	0,322366
825	AGA GAG AGA GAG A GA GYT	7	100%	1500 - 350	0,383752
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	6(1)	83,33%	750 - 200	0,191659
856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	9	100%	1400 - 400	0,340617
880	GGA GAG GAG AGG AGA	7	100%	900 - 300	0,324407
Média	-	6,14	92%	685,71	0,30887

*Valores entre parênteses refere-se às bandas monomórficas.

Análise dos dados

Preparação da matriz de entrada — O registro de dados moleculares foi realizado a partir das bandas monomórficas e polimórficas inequívocas, codificadas como ausente (0) ou presente (1). A interpretação dos padrões de bandas exibidas levou em consideração o princípio de que as bandas geradas por um mesmo *primer* e que ocuparam a mesma posição relativa indicam a amplificação do mesmo fragmento de DNA, ou seja, pertencem ao mesmo loco gênico, enquanto bandas ocupando posições relativas diferentes são de locos distintos. A partir dos 7 *primers* selecionados, foram analisados os locos polimórficos, utilizados para gerar uma matriz de dados binários de indivíduos (linhas) por bandas (colunas).

Diversidade genética, fluxo gênico e estrutura populacional — A distância genética entre os indivíduos foi estimada através do Complemento Aritmético do Índice de Jaccard (Sneath e Sokal, 1973), utilizando o programa Genes (Cruz, 2008). De acordo com Borém e Fritsche-Net (2014), quando o estudo é realizado com com táxon (indivíduos da mesma espécie) em que coincidências de ocorrência de bandas possam ser admitidas como fenômeno esperado, recomenda-se a utilização do coeficiente de Jaccard. A diversidade genética de Nei (H'), o índice de Shannon (I), a percentagem de loci polimórfico (P) e o coeficiente de divergência genética entre populações (G_{st}) foram calculados no aplicativo Popgene 3.2. A divergência genética entre populações também foi estimada através da AMOVA no aplicativo Arlequin 3.1.

A abordagem proposta em McDermott e McDonald (1993) que se baseia na teoria das estatísticas-F proposta por Wright (1951) foi utilizada para obtenção de uma estimativa indireta do fluxo gênico entre as populações, calculado no aplicativo Popgene 3.2. A estrutura populacional foi avaliada por simulações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC), utilizando os genótipos multilocus dos indivíduos amostrados para detecção de grupos genéticos prováveis (K), assumindo o modelo de populações mistas. O número de

populações estabelecidas (K), seguido de execuções independentes para cada valor de K, foi obtido por meio do programa Structure 2.3.4.

Análises multivariadas — Análises multivariadas foram utilizadas para comparar indivíduos masculinos e femininos entre as populações, e dentro delas. Análise de variância multivariada usando permutação (PERMANOVA; Anderson 2001) foi utilizada para acessar o quanto indivíduos masculinos e femininos de *M. coriacea* ocupam diferentes posições no espaço multidimensional para cada localidade (10 testes ao todo). Para estes testes, foi utilizado um fator (sexo) e dois níveis (masculino ou feminino). Foi construída uma matriz de dissimilaridade para cada localidade com base na matriz de indivíduos por banda. O complemento do coeficiente de Jaccard foi utilizado como medida de distância entre indivíduos. Valores de significância foram calculados por permutação por realocação aleatória dos níveis de fatores usando 999 permutações dos dados originais e diferenças foram consideradas significativas a alfa de 0,05. O mesmo teste foi aplicado para comparar diferenças utilizando sexo (masculino e feminino) e localidade (10 níveis) como fatores, considerando a interação entre eles, para todo o conjunto de dados. Também foi testado se as diferenças entre os grupos proposta pela análise realizada no programa Structure se dariam por diferenças na locação dos grupos no espaço multivariado. Indivíduos (linhas) com algum dado (banda) ausente foram excluídos das análises.

Diferenças entre fatores podem se dever não somente à localização das nuvens de dados no espaço multivariado, mas também ao quão disperso cada grupo se encontra em torno do centroide. Isto implica dizer que Permanova, assim como qualquer outro método multivariado de comparação de grupos, é sensível à dispersão (ou à amplitude de distribuição dos objetos em torno do centróide). Portanto, foi empregado um teste para homogeneidade da dispersão multivariada (PERMDISP; Anderson et al. 2006) para identificar se as diferenças se devem à dispersão dos objetos em torno do centróide e não somente às suas localizações no espaço multivariado para os mesmos fatores testados por

PERMANOVA: 1. sexo (dentro de cada localidade e para todas as localidades), 2. localidades (localidade e sexo como fatores, usando todo o conjunto de dados), e 3. grupos indicados pelo programa Structure. Foi utilizada a distância do Complemento Aritmético do Índice de Jaccard em todas as comparações. Box-plots foram construídos com base nas distâncias dos objetos (indivíduos) em relação aos centroides para níveis masculino e feminino dentro de cada localidade. Isto permite visualizar qual grupo de indivíduos é mais disperso ou variável.

Análise de coordenadas principais (*Principal Coordinates Analysis*, PCoA) foi utilizada como método de ordenação para visualizar os indivíduos, descritos pelas bandas, num espaço bi-dimensional. Para ordenações dentro de cada localidade, os indivíduos masculinos e femininos foram diferenciados por letras diferentes. Para ordenação geral com todo o conjunto de dados, as localidades foram diferenciadas. Dentro de cada localidade, as maiores distâncias entre pares de indivíduos de sexos diferentes foram identificadas e os respectivos “casais” selecionados. Eles indicam as maiores diferenças entre indivíduos de sexos diferentes para cada localidade. Foi utilizado o teste de Mantel (Legendre & Legendre 2012) para testar a associação entre diferenciação genética (Φ_{ST}) entre as populações e a distância geográfica entre elas. As análises multivariadas foram realizadas no ambiente R (R Core Team 2015) com auxílio do pacote vegan (Oksanen et al. 2016).

RESULTADOS

Avaliação da seleção de primers

Os sete *primers* selecionados possibilitaram a obtenção de 43 fragmentos marcantes, que variaram de 200 a 1000bp. O número de fragmentos por iniciador variou de 4 a 9, correspondendo a uma média de 6,14 bandas por *primer*. Do total de 43 locos, 40 foram polimórficos, o que resulta em um percentual de 93,02% de polimorfismo (Tabela 2). Os iniciadores 856, 880 e 825 revelaram o maior número de bandas polimórficas (9, 7, 7, respectivamente), enquanto os iniciadores 822, 811 e 807 revelaram o menor número de

bandas polimórficas (5, 5, 4, respectivamente). Os *primers* 825 e 834 apresentaram o maior e o menor conteúdo de informação polimórfica (PIC), respectivamente.

O número ótimo de marcadores obtidos pelos *primers* ISSR foi estimado em 38, no qual o valor de estresse foi inferior a 0,05 e a correlação de 0,947 (Figura 2), indicando suficiência de número de fragmentos obtidos (43) para avaliação de associações estáveis entre os indivíduos amostrados (Kruskal 1964; Silveira et al. 2003), considerando o índice de Jaccard.

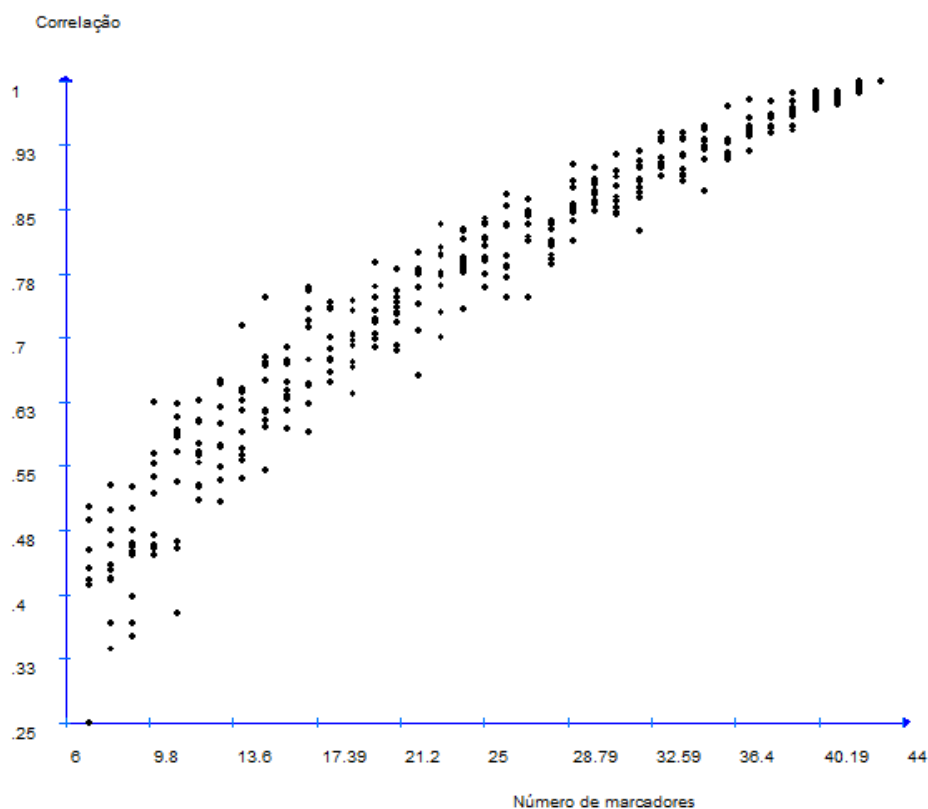


Figura 2. Coeficiente de correlação (r) e o número de fragmentos obtidos para os indivíduos de *Myrsine coriacea*. Realizado no programa GENES (Cruz 2013) com 10 simulações.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi quantificado para cada população separadamente (Tabela 3), sendo o maior valor (PIC = 0,481) registrado para a população 7 (Vargem Alta) e o menor valor (PIC= 0,0941) para a população 9 (Muqui).

Tabela 3. Primer utilizado e conteúdo de informação polimórfica (PIC) referente a cada uma das dez populações naturais estudadas de *Myrsine coriacea*. 1 – Alegre; 2 – Mimoso do Sul; 3 – Castelo; 4 – Dores do Rio Preto (Macieira); 5 – Domingos Martins; 6 – Lúna; 7 – Vargem Alta; 8 – Venda Nova do Imigrante; 9 – Muqui; 10 – Dores do Rio Preto (Casa Queimada).

Primers	Código da população e valor de PIC										Média
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
811	0,264302	0,213414	0,294514	0,261354	0,250538	0,247131	0,179473	0,262588	0,268276	0,28721	0,25288
822	0,269306	0,25262	0,273534	0,308347	0,296945	0,31568	0,337767	0,331012	0,300349	0,344538	0,30301
856	0,343882	0,321423	0,341927	0,239847	0,237796	0,329992	0,317777	0,306026	0,363533	0,319803	0,312201
880	0,372417	0,253255	0,276595	0,267401	0,393952	0,22318	0,347695	0,274342	0,278486	0,29202	0,297934
825	0,410705	0,402197	0,343715	0,367044	0,279246	0,260083	0,24948	0,36848	0,259864	0,333608	0,327442
807	0,320034	0,321326	0,074914	0,226642	0,160748	0,199129	0,481483	0,432561	0,242842	0,236333	0,269601
834	0,125674	0,218989	0,185204	0,18022	0,21012	0,238709	0,213633	0,189529	0,094152	0,142099	0,179833

Diversidade genética, fluxo gênico e estrutura populacional

A população 1 (Alegre) apresentou os maiores valores para o índice de Shannon ($I = 0,4500$) e para a diversidade de Nei ($H' = 0,3088$), ao passo que a população 5 (Domingos Martins) apresentou os menores valores ($I = 0,3850$ e $H' = 0,2581$, respectivamente), considerando os indivíduos masculinos e femininos em conjunto (Tabela 4).

Tabela 4. Diversidade genética dentro das dez populações naturais estudadas de *Myrsine coriacea*. n = número de indivíduos de cada localidade; F – indivíduo feminino, M – indivíduo masculino; H' = diversidade gênica de Nei (1973); I = Índice de diversidade gênica de Shannon (Lewontin, 1972); P = porcentagem de polimorfismo. 1 – Alegre; 2 – Mimoso do Sul; 3 – Castelo; 4 – Dores do Rio Preto (Macieira); 5 – Domingos Martins; 6 – Iúna; 7 – Vargem Alta; 8 – Venda Nova do Imigrante; 9 – Muqui; 10 – Dores do Rio Preto (Casa Queimada).

Código da população	Número de indivíduos das populações	H'	I	P (%)	Identificação do indivíduo a campo
					Maior dissimilaridade
1	Feminino (n = 17)	0,3092	0,4514	79,07	F = 623 e M = 624 = 0,76
	Masculino (n = 17)	0,2956	0,4328	76,74	F = 622 e M = 600 = 0,72
	Geral (n = 34)	0,3088	0,4500	79,07	F = 620 e M = 618 = 0,72
2	Feminino (n = 15)	0,2828	0,4192	76,74	F = 648 e M = 647 = 0,81
	Masculino (n = 15)	0,2850	0,4228	76,74	F = 648 e M = 667 = 0,81
	Geral (n = 30)	0,2885	0,4262	76,74	F = 656 e M = 649 = 0,80
3	Feminino (n = 6)	0,2530	0,3742	67,44	F = 682 e M = 685 = 0,78
	Masculino (n = 6)	0,2492	0,3693	67,44	F = 690 e M = 685 = 0,76
	Geral (n = 12)	0,2714	0,4025	74,42	F = 688 e M = 685 = 0,75
4	Feminino (n = 16)	0,2636	0,3842	67,44	F = 762 e M = 737 = 0,80
	Masculino (n = 16)	0,2672	0,3940	72,09	F = 762 e M = 735 = 0,78
	Geral (n = 32)	0,2660	0,3900	72,09	F = 746 e M = 737 = 0,78
5	Feminino (n = 10)	0,2704	0,3991	72,09	F = 774 e M = 779 = 0,78
	Masculino (n = 12)	0,2565	0,3826	72,09	F = 778 e M = 777 = 0,76
	Geral (n = 22)	0,2581	0,3850	74,42	F = 794 e M = 777 = 0,75
6	Feminino (n = 11)	0,2312	0,3423	62,79	F = 842 e M = 855 = 0,74
	Masculino (n = 11)	0,2729	0,4039	74,42	F = 856 e M = 843 = 0,73
	Geral (n = 22)	0,2650	0,3942	74,42	F = 858 e M = 847 = 0,71
7	Feminino (n = 9)	0,2743	0,4012	69,77	F = 914 e M = 927 = 0,65
	Masculino (n = 9)	0,2461	0,3574	60,47	F = 920 e M = 915 = 0,65
	Geral (n = 18)	0,2985	0,4379	76,74	F = 918 e M = 915 = 0,64
8	Feminino (n = 12)	0,2847	0,4169	74,42	F = 1006 e M = 1019 = 0,63
	Masculino (n = 12)	0,2634	0,3908	72,09	F = 1018 e M = 1023 = 0,61
	Geral (n = 24)	0,3044	0,4522	83,72	F = 1004 e M = 1023 = 0,60
9	Feminino (n = 12)	0,2462	0,3642	67,44	F = 1056 e M = 1057 = 0,82
	Masculino (n = 13)	0,2280	0,3368	62,79	F = 1030 e M = 1053 = 0,76
	Geral (n = 27)	0,2656	0,3958	74,42	F = 1056 e M = 1031 = 0,75
10	Feminino (n = 14)	0,2759	0,4066	74,42	F = 1528 e M = 1523 = 0,74
	Masculino (n = 14)	0,2846	0,4188	74,42	F = 1502 e M = 1523 = 0,71
	Geral (n = 28)	0,2840	0,4196	76,74	F = 1528 e M = 1501 = 0,64

Os maiores valores de diversidade intrapopulacional (Tabela 4) da população 1 (Alegre) se mantiveram quando os indivíduos femininos (I = 0,4514; H' = 0,3092) e masculinos (I = 0,4328; H' = 0,2956) foram analisados separadamente. No entanto, os

menores valores de diversidade genética intrapopulacional considerando apenas indivíduos femininos ($I = 0,3423$; $H' = 0,2312$) foram registrados para a população 6 (Iúna), e considerando apenas indivíduos masculinos ($I = 0,3368$; $H' = 0,2280$) para a população 9 (Muqui).

A maior porcentagem de polimorfismo (Tabela 4) considerando indivíduos masculinos e femininos ($P = 83,72\%$) foi registrada para a população 8 (Venda Nova do Imigrante), enquanto a menor ($P = 72,09$) foi registrada para a população 4 (Dores do Rio Preto – Macieira). Considerando apenas os indivíduos femininos, a maior porcentagem de polimorfismo ($P = 79,07\%$) foi registrada para população 1 (Alegre) e a menor ($P = 60,47\%$) para população 6 (Iúna). Considerando apenas os indivíduos masculinos, a maior porcentagem de polimorfismo ($P = 76,74\%$) foi registrada para as populações 1 (Alegre) e 2 (Mimoso do Sul), e a menor ($P = 60,47\%$) para a a população 7 (Vargem Alta). Os indivíduos masculinos e femininos de cada localidade, identificados em campo, que apresentaram a maior dissimilaridade e menor dissimilaridade com base no complemento aritmético do índice de Jaccard, estão listados na tabela 4.

O valor de diferenciação genética entre as populações (Φ_{ST}) foi de 0,12081. O coeficiente de divergência genética entre populações (G_{ST}) foi de 0,1068, corroborando com o resultado do Φ_{ST} . A AMOVA mostrou que a diversidade genética intrapopulacional é maior (87,92%) que a diversidade genética interpopulacional, e baixa diferenciação genética (1,63%) entre as regiões 1 (Alegre), 2 (Mimoso do sul), 4 (Dores do Rio Preto - Macieira), 6 (Iúna), 9 (Muqui), 10 (Dores do Rio Preto – Casa Queimada) e 3 (Catelo), 5 (Domingos Martins), 7 (Vargem Alta), 8 (Venda Nova do Imigrante).

A média do valor de fluxo gênico entre as 10 populações estudadas foi de 4,18. O maior valor ($\Phi_{ST} = 0,1865$) de diferenciação genética das populações analisadas duas a duas (Tabela 5) foi estimado entre as populações 4 (Dores do Rio Preto – Macieira) e 5 (Domingos Martins), enquanto que o menor valor ($\Phi_{ST} = 0,0051$) foi registrado entre as populações da localidade 1 (Alegre) e da localidade 2 (Mimoso do Sul).

Tabela 5. Valores de diferenciação genética (Φ_{ST}) calculado para cada par de localidades, duas a duas. 1 – Alegre; 2 – Mimoso do Sul; 3 – Castelo; 4 – Dores do Rio Preto (Macieira); 5 – Domingos Martins; 6 – Iúna; 7 – Vargem Alta; 8 – Venda Nova do Imigrante; 9 – Muqui; 10 – Dores do Rio Preto (Casa Queimada).

Número da população	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0,005	0	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0,058	0,056	0	-	-	-	-	-	-	-
4	0,103	0,089	0,182	0	-	-	-	-	-	-
5	0,164	0,166	0,162	0,186	0	-	-	-	-	-
6	0,152	0,123	0,142	0,145	0,095	0	-	-	-	-
7	0,151	0,154	0,183	0,158	0,099	0,051	0	-	-	-
8	0,143	0,126	0,183	0,163	0,115	0,009	0,048	0	-	-
9	0,123	0,115	0,166	0,136	0,120	0,073	0,073	0,032	0	-
10	0,085	0,082	0,176	0,128	0,129	0,093	0,088	0,066	0,046	0

As marcas genéticas encontradas em cada um dos indivíduos definiram o número correto de grupos, baseando na taxa de mudança no $\ln(k)$, estatística ΔK , indicando uma convergência para dois grupos bayesianos, ou seja, $K=2$ (Figura 3). Os grupos formados indicam moderada diferenciação genética (Figura 4). O teste de Mantel corroborou este resultado, dado que revelou não haver correlação entre as distâncias genéticas e as distância geográficas das populações estudadas ($r = 0,06$, $p = 0,181$).

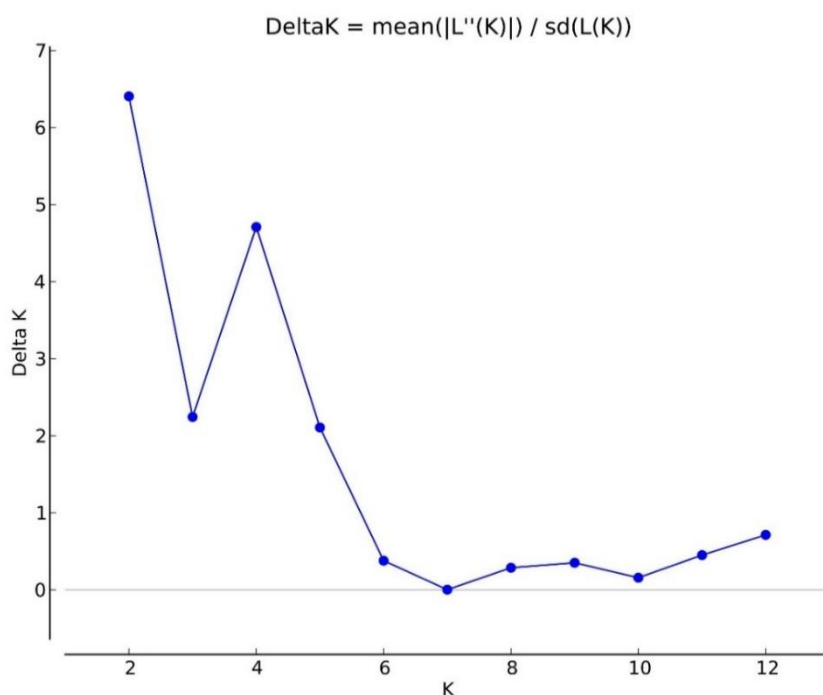


Figura 3. Gráfico evidenciando K(2), seguindo o critério proposto por Evano et al. (2005) para definição do número correto de grupos, com base na taxa de mudança no Ln(k).

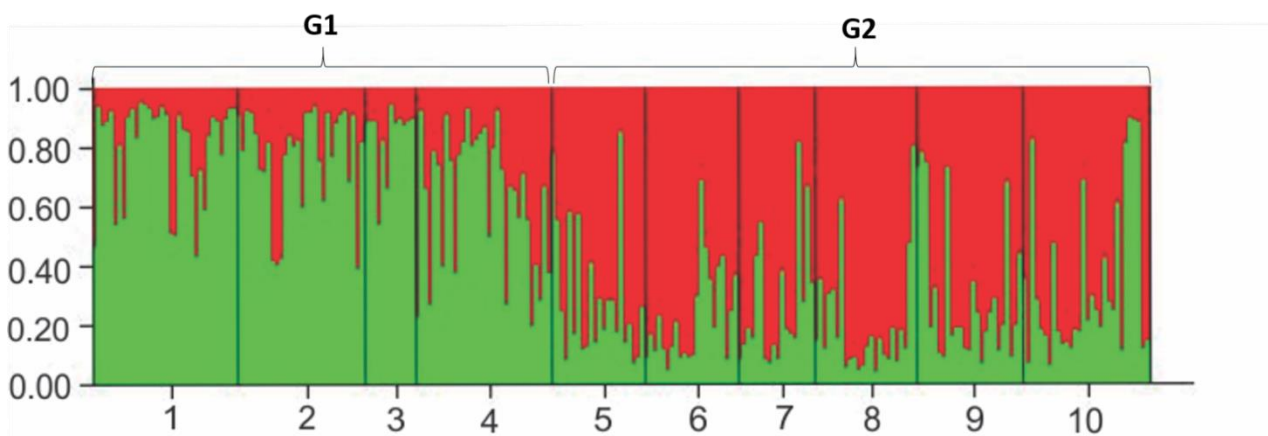


Figura 4. Representação gráfica da análise bayesiana realizada no aplicativo Structure, dos 249 indivíduos das dez populações naturais estudadas de *Myrsine coriacea*, com base em dados moleculares obtidos a partir dos perfis de amplificação de sete marcadores ISSR. As linhas verticais delimitam as localidades. O valor de $K = 2$ evidencia duas populações moderadamente estruturadas: G1:1 a 4; G2:5 a 10. 1 – Alegre; 2 – Mimoso do Sul; 3 – Castelo; 4 – Dolores do Rio Preto (Macieira); 5 – Domingos Martins; 6 – Iúna; 7 – Vargem Alta; 8 – Venda Nova do Imigrante; 9 – Muqui; 10 – Dolores do Rio Preto (Casa Queimada).

Comparações multivariadas

Não foram detectadas diferenças entre indivíduos masculinos e femininos dentro de cada população (Tabela 6). Considerando todo o conjunto de dados e dois fatores (sexo e

localidade), foram detectadas diferenças significativas entre as populações, mas não entre os sexos, sendo que não houve interação significativa entre os dois fatores (Tabela 7). Não foram detectadas diferenças entre sexos na dispersão dos dados, porém diferenças entre localidades também se deveram a diferenças na dispersão (Tabela 7). Assim como nas comparações entre localidades, a estrutura de grupos fornecida pela análise de agrupamento Bayesiana se mostrou significativa tanto na locação quanto na dispersão.

Tabela 6. Resultados dos testes de locação (PERMANOVA) e de dispersão (PERMDISP) dentro de cada uma das 10 localidades utilizando sexo como fator com dois níveis (masculino e feminino) em *Myrsine coriacea* usando 7 marcadores ISSR. 1 – Alegre; 2 – Mimoso do Sul; 3 – Castelo; 4 – Dores do Rio Preto (Macieira); 5 – Domingos Martins; 6 – Lúna; 7 – Vargem Alta; 8 – Venda Nova do Imigrante; 9 – Muqui; 10 – Dores do Rio Preto (Casa Queimada).

Código da localidade	PERMANOVA			PERMDISP		$n_{\text{♂}}$	$n_{\text{♀}}$	N
	F	R ²	P	F	P			
1	0,95	0,03	0,528	0,84	0,343	17	17	34
2	0,35	0,01	0,972	0,30	0,557	15	15	30
3	0,68	0,07	0,791	0,39	0,540	6	6	11
4	0,73	0,02	0,688	0,62	0,444	15	16	31
5	1,21	0,07	0,263	0,34	0,597	10	9	19
6	0,73	0,04	0,692	0,72	0,400	10	11	21
7	0,74	0,05	0,739	0,06	0,837	8	8	16
8	1,53	0,07	0,109	0,16	0,710	11	12	23
9	0,47	0,02	0,922	0,15	0,705	14	13	27
10	0,37	0,01	0,947	0,11	0,744	14	13	27

Tabela 7. Resultados dos testes multivariados de locação (PERMANOVA) e de dispersão (PERMDISP) para todo o conjunto de dados considerando dois fatores (sexo e localidade) e a interação entre eles, e entre os dois grupos identificados no programa Structure. Valores significativos destacados em negrito ($P < 0.05$).

Fator	PERMANOVA				PERMDISP		
	gl	F	R ²	P	gl	F	P
Sexo	1	0,76	0,003	0,695	1	0,86	0,388
Localidade	9	5,64	0,18	0,001	9	2,52	0,015
Sexo: Localidade	9	0,73	0,02	0,981	-	-	-
Entre grupos	1	17,67	0,07	0,001	1	6,59	0,009

Comparações pareadas entre as populações de cada localidade demonstraram que a maior parte delas difere entre si, à exceção dos pares (Tabela 8): Mimoso (2) vs Alegre (1) e Mimoso (2) vs Castelo (3); Venda Nova (8) vs Lúna (6) e Venda Nova (8) vs Muqui (9). Isto está em concordância com a estrutura de grupos proposta pelos resultados gerados pela análise de agrupamento Bayesiana. Em geral, apesar de indivíduos masculinos e femininos

não diferirem dentro de cada localidade (Fig. 5a,c,e,g,i, k,m,o,q,s), a dispersão dentro de cada nível tendeu a variar entre as localidades (Fig. 5b, d, e, f, h, j, l, n,p, r, t), sendo possível identificar os pares de indivíduos masculinos e femininos mais dissimilares entre si, bem como os indivíduos mais distintos dos demais dentro de uma dada população. A Análise de coordenadas principais para os grupos definidos pela análise realizada no programa Structure separou as populações em dois grupos (Grupo 1: populações 1 a 4; Grupo 2: populações 6 a 10) (Figura 6).

Tabela 8. Resultados das comparações pareadas de PERMANOVA entre cada localidade estudada. P ajustado por Bonferroni. 1 – Alegre; 2 – Mimoso do Sul; 3 – Castelo; 4 – Dolores do Rio Preto (Macieira); 5 – Domingos Martins; 6 – Iúna; 7 – Vargem Alta; 8 – Venda Nova do Imigrante; 9 – Muqui; 10 – Dolores do Rio Preto (Casa Queimada). Valores significativos destacados em negrito ($P < 0.05$).

Comparação	F	R ²	P	P ajustado
1vs2	0.93	0.01	0.522	1.000
1vs3	2.62	0.06	0.001	0.045
1vs4	7.01	0.10	0.001	0.045
1vs5	9.32	0.15	0.001	0.045
1vs6	8.95	0.14	0.001	0.045
1vs7	7.90	0.14	0.001	0.045
1vs8	7.27	0.12	0.001	0.045
1vs9	7.51	0.12	0.001	0.045
1vs10	4.52	0.07	0.001	0.045
2vs3	1.76	0.04	0.071	1.000
2vs4	6.07	0.09	0.001	0.045
2vs5	8.53	0.15	0.001	0.045
2vs6	7.11	0.13	0.001	0.045
2vs7	7.95	0.15	0.001	0.045
2vs8	5.92	0.10	0.001	0.045
2vs9	6.86	0.11	0.001	0.045
2vs10	4.51	0.07	0.001	0.045
3vs4	6.17	0.13	0.001	0.045
3vs5	5.54	0.17	0.001	0.045
3vs6	4.40	0.13	0.001	0.045
3vs7	5.64	0.18	0.001	0.045
3vs8	5.47	0.15	0.001	0.045
3vs9	5.28	0.13	0.001	0.045
3vs10	5.89	0.13	0.001	0.045
4vs5	9.96	0.17	0.001	0.045
4vs6	8.75	0.15	0.001	0.045

4vs7	8.44	0.16	0.001	0.045
4vs8	8.33	0.14	0.001	0.045
4vs9	7.80	0.13	0.001	0.045
4vs10	7.37	0.11	0.001	0.045
5vs6	4.88	0.11	0.001	0.045
5vs7	3.63	0.10	0.001	0.045
5vs8	6.05	0.13	0.001	0.045
5vs9	6.00	0.13	0.001	0.045
5vs10	7.06	0.13	0.001	0.045
6vs7	3.04	0.08	0.001	0.045
6vs8	1.62	0.04	0.090	1.000
6vs9	4.47	0.09	0.001	0.045
6vs10	6.10	0.11	0.001	0.045
7vs8	2.41	0.06	0.009	0.405
7vs9	3.53	0.08	0.001	0.045
7vs10	4.90	0.10	0.001	0.045
8vs9	2.30	0.05	0.017	0.765
8vs10	3.75	0.07	0.001	0.045
9vs10	3.35	0.06	0.001	0.045

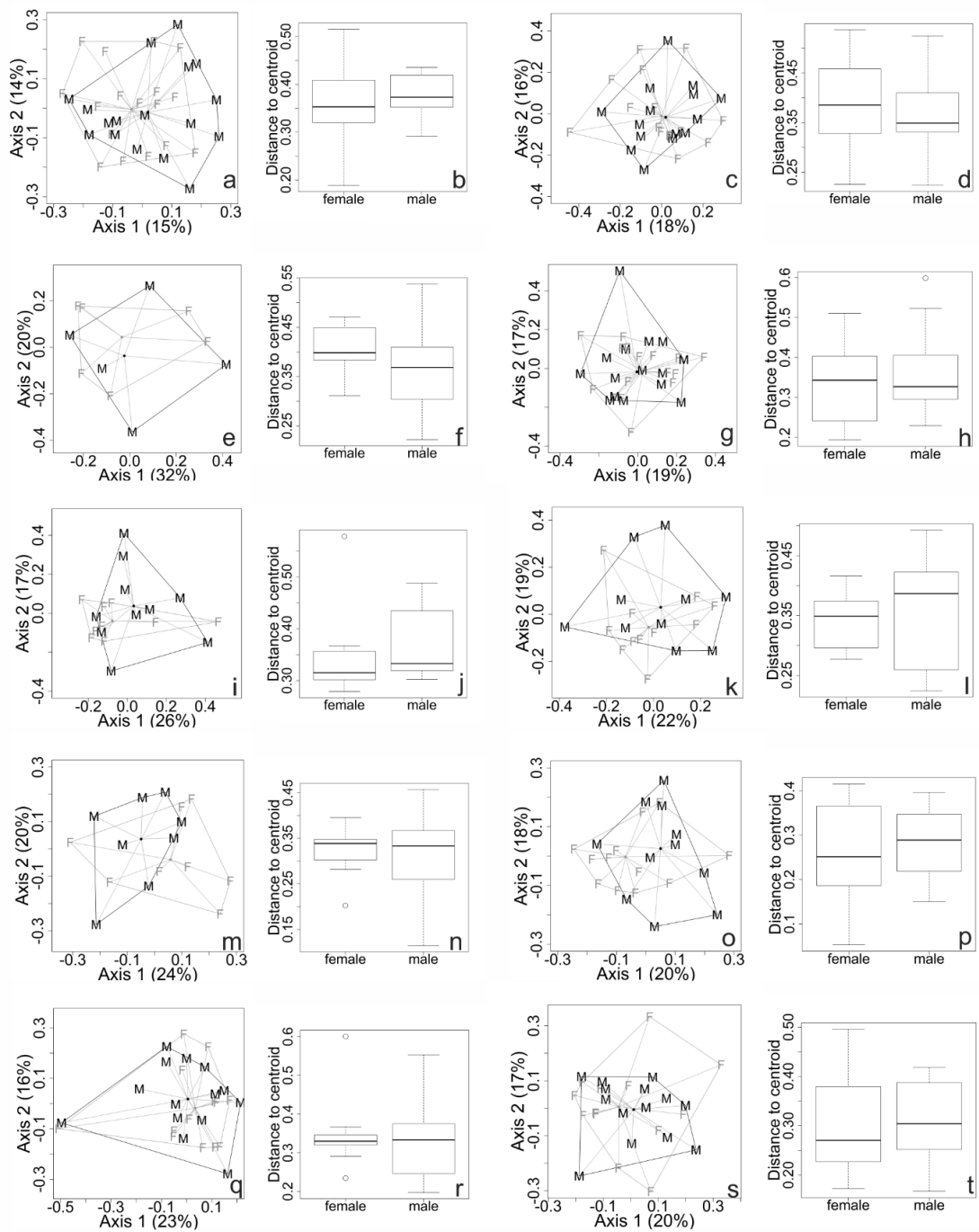


Figura 5. Análise de coordenadas principais para cada localidade. a, b: Localidade 1 (Alegre); c, d: Localidade 2 (Mimoso do Sul); e, f: Localidade 3 (Castelo); g, h: Localidade 4 (Dores do Rio Preto-Macieira); i, j: Localidade 5 (Domingos Martins); k, l: Localidade 6 (Iúna); m, n: Localidade 7 (Vargem Alta); o, p: Localidade 8 (Venda Nova); q, r: Localidade 9 (Muqui); s, t: Localidade 10 (Dores do Rio Preto - Casa Queimada). M - indivíduos masculinos (em preto); F- indivíduos femininos(em cinza). Pontos no centro de cada grupo indicam a posição do centróide. Linhas contínuas indicam o envelope da distribuição (*convexhull*) de cada sexo. Box-plots mostram as distribuições dos valores de distância de cada indivíduo ao centróide da distribuição no espaço multivariado.

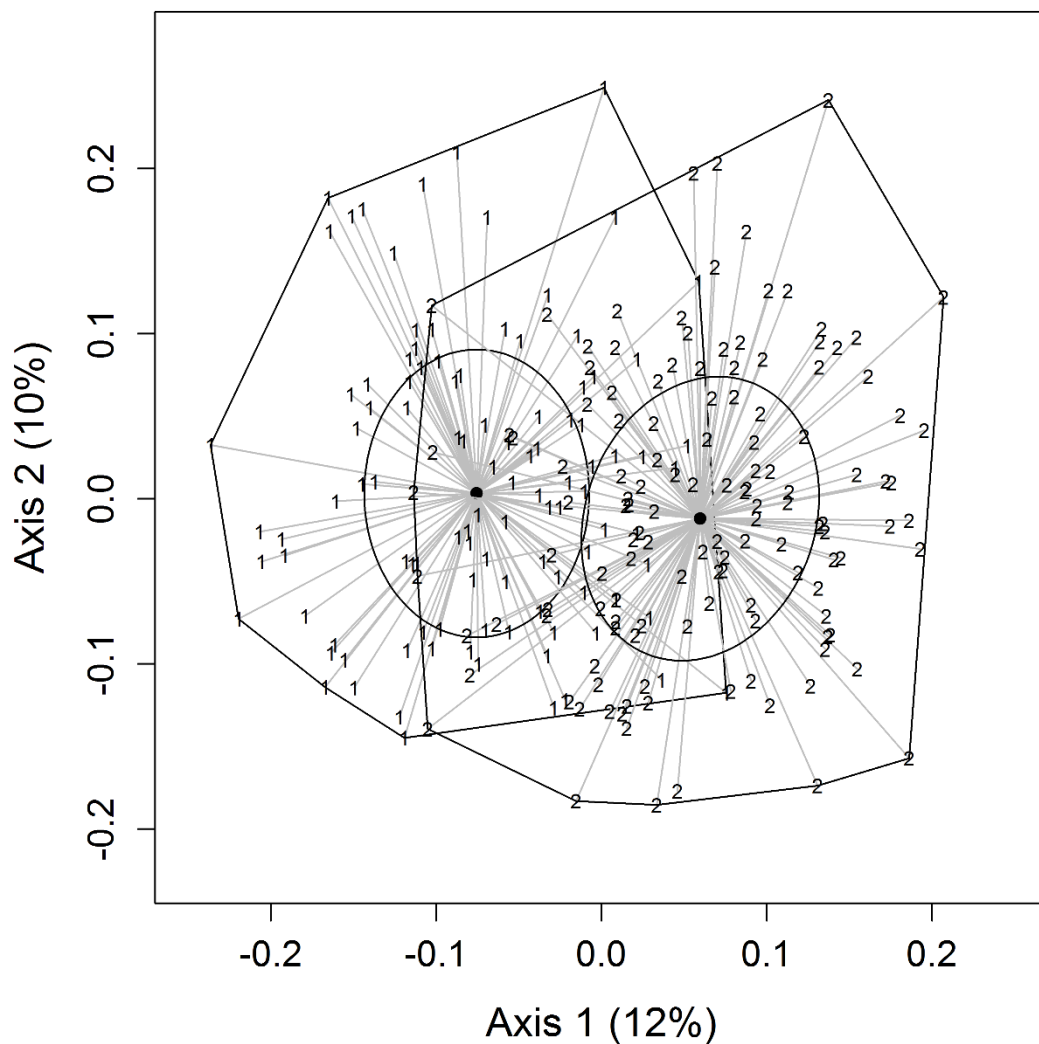


Figura 6. Análise de coordenadas principais para os grupos definidos pela análise realizada no programa Structure (Grupo 1: populações 1 a 4; Grupo 2: populações 6 a 10). Pontos no centro de cada grupo indicam a posição do centróide. Linhas contínuas indicam o envelope da distribuição (*convexhull*) de cada sexo. Elipses indicam o desvio padrão de cada grupo. Box-plots mostram as distribuições dos valores de distância de cada indivíduo ao centróide da distribuição no espaço multivariado. 1 – Alegre; 2 – Mimoso do Sul; 3 – Castelo; 4 – Dores do Rio Preto (Macieira); 5 – Domingos Martins; 6 – Iúna; 7 – Vargem Alta; 8 – Venda Nova do Imigrante; 9 – Muqui; 10 – Dores do Rio Preto (Casa Queimada).

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados indicam altos níveis de polimorfismo e de diversidade genética em *M. coriacea*. A maior diversidade genética registrada dentro das populações em comparação à diferenciação genética moderada entre elas, indica um fluxo gênico histórico interpopulacional, apesar da distância e do isolamento aos quais as populações estão submetidas. Os dois grupos de populações evidenciados pelos resultados da estatística ΔK

não representam regiões geográficas contrastantes considerando aspectos fitofisionômicos ou ambientais (p. ex. elevação, temperatura). As análises de diversidade genética realizadas para indivíduos masculinos e femininos separadamente também não indicou diferenças genéticas entre os morfos sexuais. Estes resultados sugerem que a deriva genética não está causando grande diferenciação entre as populações, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo alto fluxo gênico propiciado pela polinização anemocórica e pela dispersão de propágulos ornitocórica, características da espécie.

A proporção de loci polimórfico é uma medida que indica a variabilidade genética encontrada na população, e pode indicar se estas estão sob efeito de deriva genética. A proporção de loci polimórficos detectada para populações de *M. coriacea* pode ser considerada elevada, quando comparada aos resultados de estudos anteriores realizados com espécies subordinadas a outros gêneros de Primulaceae. As proporções de loci polimórficos variaram de 76,79 à 83,93% e 58,49 à 64,15% em *Androsace tapete* (Geng et al. 2009) e *Primula interjacens* (Da-Wei et al. 2004), respectivamente. Essas espécies, assim como *M. coriacea*, também apresentam um padrão gregário de distribuição, são perenes e possuem polinização cruzada obrigatória, diferindo pelo porte herbáceo e pela distribuição espacial em manchas contínuas no mesmo ambiente. As diferentes proporções de loci polimórficos detectadas entre as populações estudadas podem estar sendo influenciadas pelos diferentes padrões de agregação espacial (distância entre os indivíduos) de cada população. Os menores valores de polimorfismo foram registrados para a população 4, que formava uma mancha pequena e distinta na qual os indivíduos coletados encontravam-se próximos uns aos outros. Essa população pode ter se originado de um mesmo evento de dispersão (efeito fundador), ou das mesmas plantas-mãe. Ao contrário, os maiores valores de polimorfismo foram encontrados para as populações 1 e 8, que formavam manchas maiores. Nessas manchas, os indivíduos encontravam-se espacialmente dispersos.

Os índices de Shannon (I) e Nei (H') indicam a quantidade de diversidade genética existente na população, e complementam a informação sobre a proporção dos loci polimórficos. Os valores para esses índices encontrados nas populações de *Myrsine coriacea* (I = 0,3850 - 0,4500 e H' = 0,2581 - 0,3088) são altos quando comparados àqueles reportados para espécies igualmente perenes e de polinização cruzada obrigatória de Primulaceae, como *Primula apennina* (I = 0,27 a 0,35 e H' = 0,17 a 0,23) por Crema et al. (2009) e para *Primula obconica* (I = 0,04 a 0,3 e H' = 0,03 a 0,20) por Nan et al. (2003). O sistema de acasalamento pode influenciar nos resultados encontrados. A variação genética intrapopulacional alta em *M. coriacea* é esperada, pois espécies dioicas em ambientes naturais tendem a apresentar alta diversidade genética dentro das populações e baixa diferenciação genética entre elas devido à polinização cruzada obrigatória (Hamrick e Godt 1996). A existência de variabilidade genética significativa é de fundamental importância para a conservação da espécie, assim como para garantir vigor e resistência das progêneses visando a marcação de matrizes para a coleta de sementes para fins silviculturais.

As análises multivariadas e de diversidade interpopulacional indicaram uma divergência genética significativa entre as populações. A diferenciação genética moderada entre as dez populações estudadas indicada pelos valores de ϕ_{ST} 0,12081 e G_{ST} 0,1068 (Hartl e Clark 2010), sugere o início do processo de diferenciação entre as populações. Ge e Sun (1999) realizaram um estudo de diversidade genética com a espécie *Aegiceras corniculatum*, um arbusto igualmente perene, pertencente a família Primulaceae, porém autogâmico e que ocorre em vegetação de mangue. Neste estudo, os autores encontraram valores de G_{ST} (0,17) mais altos comparados aos encontrados nesse estudo para *Myrsine coriacea*. Esses resultados apontam para a influência do sistema sexual, que é bastante variado em Primulaceae, na diferenciação genética interpopulacional. Ao contrário de *M. coriacea*, *Aegiceras corniculatum* é uma espécie autogâmica cujos propágulos flutuantes podem tanto ser dispersados pela água, quanto se estabelecerem localmente próximo a planta mãe. Este segundo cenário poderia explicar os níveis de diferenciação genética

interpopulacional altos entre as populações desta espécie, quando comparados aos valores encontrados para as populações de *M. coriacea*. O estudo de Wang et al. (2014) também aponta para explicação semelhante. Estes autores encontraram níveis mais altos de diferenciação genética entre populações naturais de *Primula cicutariifolia* ($G_{ST} = 0,71$), comparado aos resultados aqui registrados para *M. coriacea*. *Primula cicutariifolia* é uma erva bianual que possui frutos capsulares, cujas sementes apresentam limitada capacidade de dispersão pelo vento comparado a diáporos ornitocoóricos, como os de *Myrsine*. Outra característica biológica de *Primula cicutariifolia* que pode ajudar a entender os menores valores de G_{ST} encontrados *M. coriacea* comparado a esta espécie, é que as flores de *P. cicutariifolia* são homostílicas (anteras e estigma estão no mesmo nível) e auto-compatíveis, permitindo auto-fecundação. Suas flores são pequenas (sem néctar) e embutidas nas folhas, sendo pouco visitadas por insetos, dificultando a polinização cruzada. Consequentemente, o fluxo de genes entre e dentro de populações via pólen e sementes é limitado.

O maior valor de diferenciação genética das populações duas a duas, foi encontrado entre as populações 4 e 5 ($\phi_{ST} = 0,1865$), distantes entre si por 182 Km (medidos em linha reta). Já os menores valores foram registrados para as populações 1 e 2 ($\phi_{ST} = 0,0051$), distantes entre si por 59 Km (medidos em linha reta). Apesar desses valores contrastantes sugerirem haver uma correlação entre as distâncias genéticas e geográficas nas populações de *M. coriacea*, a análise de Mantel não sustentou esses resultados quando incluídas as dez populações estudadas. O grau de diferenciação genética pode fornecer uma estimativa do fluxo gênico histórico das populações. A eficiência na dispersão de grãos de pólen e sementes favorece o fluxo gênico, aumenta a variação genética dentro das populações e diminui a divergência entre elas. Portanto, espécies cujos agentes polinizadores propiciem a dispersão dos grãos pólen a grandes distâncias (como vento, aves ou morcegos), e os dispersores distribuam as sementes por grandes extensões (como vento ou animais de grande porte), tendem a apresentar mais variabilidade genética dentro de populações e um

fluxo gênico mais alto entre as populações (Mori 2003). Neste cenário, é razoável supor que a polinização anemofílica e a dispersão de sementes realizada principalmente por aves em *M. coriacea* propiciem fluxo gênico suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética.

Os valores de diversidade genética semelhantes entre indivíduos masculinos e femininos pode ser resultante da razão sexual equilibrada na espécie. Organismos com reprodução sexuada tendem a apresentar razão sexual 1:1, ou seja, não há diferença entre os sexos (Fisher 1930). Os desvios da proporção sexual de 1:1 entre indivíduos masculinos e femininos nas progênes tornam o valor do tamanho efetivo populacional menor (Vencovsky et al. 2012). Quando a diversidade genética e razão sexual da espécie é de 1:1, os efeitos da deriva genética são minimizados a ponto de não atuar desequilibrando a diversidade genética entre os morfos sexuais. Dessa forma, a diversidade genética equilibrada entre os morfos sexuais pode estar contribuindo para a alta diversidade genética geral das populações. Altos níveis de diversidade genética favorecem uma espécie a lidar com a mudança do ambiente e flutuações tanto no curto como no longo prazo (Ellstrand e Elam 1993; Qiu et al. 2006). Portanto, um dos principais objetivos da conservação é a manutenção da diversidade genética e dos processos evolutivos em populações viáveis, a fim de evitar extinção (Godt e Hamrick 1998).

CONCLUSÃO

A estrutura genética de *M. coriacea* está associada ao seu padrão reprodutivo e a aspectos demográficos das populações. A distância geográfica não está correlacionada ao grau de diferenciação genética entre populações desta espécie, e o fluxo gênico é facilitado pela polinização anemocórica e pela dispersão dos frutos por aves. Considerando que a estrutura genética de populações naturais é um pré-requisito ao entendimento de aspectos relacionados à conservação e manejo de espécies, concluímos que as populações de *M. coriacea* não estão sujeitas à perda da variabilidade genética apesar do isolamento espacial de suas populações propiciado pelo padrão de distribuição em manchas. Por essa mesma razão, essas populações apresentam potencial para marcação de matrizes com finalidade de coleta de sementes para fins florestais. Não é necessário recorrer a todas as dez populações estudadas para obtenção de sementes, visto a alta diversidade genética intrapopulacional. Por fim, lançamos a hipótese para ser testada por estudos futuros de que a diversidade genética equilibrada entre indivíduos masculinos e femininos seja influenciada pela razão sexual equilibrada entre dos morfos em seus ambientes de ocorrência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2016, 181, 1–20.

ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, 26, 32–46, 2001.

ANDERSON, M.J. Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics*, 62, 245–253, 2006.

ANSARI, S. A., NARAYANAN, C., WALI, S. A., KUMAR, R., SHUKLA, N. and RAHANGDALE, S. K. ISSR markers for analysis of molecular diversity and genetic structure of Indian teak (*Tectona grandis* L.f.) populations. **Annals of Forest Research**. 55: 11-23, 2012

BAWA, K. S. 2004. Impacts of Global Changes on Reproductive Biology of Trees in Tropical Dry Forests. In: Frankie, G.W., Mata, A. e Vinson, S.B. Biodiversity Conservation in Costa Rica – Learning the Lessons in a Seasonal Dry Forest. University of California Press, Berkeley, Los Angeles. Pp. 34-47.

BAWA, K. S. Evolution of dioecy in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics** 11: 15-39, 1980.

BAWA, K.S. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution* 28:85-92.

BAWA, K.S. e OPLER, P.A. 1975. Dioecism in tropical forest trees. *Evolution* 29:167-179.

BEGNINI, R.M., SILVA, F.R. & CASTELLANI, T.T. 2013. Fenologia reprodutiva de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman (Arecaceae) em Floresta Atlântica no sul do Brasil. *Biotemas* 4: 53-60.

BORÉM, A; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars**. Academic Press is an imprint of Elsevier, ISBN: 978-0-12-418672-9, 2014.

BRAZIL FLORA GROUP (BFG). Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66: 1085-1113, 2015.

BUZATTIL, R. S. O.; RIBEIRO, R. A.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Fine-scale spatial genetic structure of *Dalbergia nigra* (Fabaceae), a threatened and endemic tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 4, 838-846 (2012).

CARNAVAL, A.C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. **Science**, v. 323, p. 785-789, 2009.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Embrapa - CNDP/SPI, Brasília. 640p. 1994.

CHARLESWORTH, B. e CHARLESWORTH, D. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. **The American Naturalist** 112: 975-997, 1978.

CREMA, S., CRISTOFOLINI, G., ROSSI, M., CONTE, L. High genetic diversity detected in the endemic *Primula apennina* Widmer (Primulaceae) using ISSR fingerprinting. **Plant Syst Evol** 280:29–36, 2009.

CRUZ, C. D. **Programa Genes** - Diversidade Genética. Editora UFV, Viçosa, 278p, 2008.

DA-WEI, XUE.; XUE-JUN, GE.; GANG, HAO.; CHANG-QIN, ZHANG. High Genetic Diversity in a Rare, Narrowly Endemic Primrose Species: *Primula interjacens* by ISSR Analysis. **Acta Botanica Sinica**, Vol.46 No.10 2004.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

ELLSTRAND, N.; ELAM, E. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 217-241, 1993.

FISHER, R. A. **The genetical theory of natural selection**. London: Oxford University Press, 1930.

FREITAS, M. F.; CARRIJO, T. T.; A família Myrsinaceae nos contrafortes do maciço da Tijuca e entorno do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, n. 4, p. 813-828, 2008.

FREITAS, M. F.; KINOSHITA, L. S. *Myrsine* (Myrsinoideae- Primulaceae) no sudeste e sul do Brasil. **Rodriguésia** 66(1): 167-189. 2015.

FREITAS, M.F.; CARRIJO, T.T.; SÃO LEÃO, L.C. e KINOSHITA, L.S. 2009. **Flora da Serra do Cipó: Myrsinaceae**. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo 27: 259-267.

GE, X. J.; SUN, M. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. **Molecular Ecology**, 8, 2061–2069, 1999.

GENG, Y., TANG, S., TASHI, T., SONG., Z., ZHANG, G., ZENG, L., ZHAO, J., WANG, L., SHI, J., CHEN, J., ZHONG, Y. Fine- and landscape-scale spatial genetic structure of cushion rockjasmine, *Androsace tapete* (Primulaceae), across southern Qinghai-Tibetan Plateau. **Genetica** 135:419–427, 2009.

GOIS, I. B.; FERREIRA, R. A.; SILVA-MANN, R.; BLANK, M. F. A.; SANTOS NETO, E. M. Diversidade genética entre indivíduos de *Spondias lutea* L. procedentes do Baixo São Francisco Sergipano, por meio de marcadores RAPD. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.38, n.2, p.261-269, 2014.

GONÇALVES, L. O.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-MANN, R. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 290-298, abr-jun, 2014.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.** 351, 1291–1298, 1996.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4ª ed. Editora Artmed: Porto Alegre, 2010.

HOELTGEBAUM, M.P.1*; BERNARDI, A.P.1; MONTAGNA, T.1; REIS, M.S. Diversidade e estrutura genética de populações de *Varronia curassavica* Jacq. em restingas da Ilha de Santa Catarina. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1083-1090, 2015.

HUGHES, A. R.; INOUE, B. D. JOHNSON, M. T. J.; UNDERWOOD, N. VELLEND, M. **Ecological consequences of genetic diversity**. *Ecology Letters*, 11: 609–623. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x, 2008.

JESUS, S.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Frugivoria por aves em *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) e *Myrsine coriacea* (Myrsinaceae). **Rev. Bras. Ornitol.** 15, 585–591 (2007).

JONES, C. J.; EDWARDS, K. J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M.O.; SALE, F.; VAN, C. W.; BREDEMEIJER, G.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSHI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding** 3:381–390, 1997.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a non-metric hypothesis. **Psychometrika**, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.

KUMAR, A., ARYA, L., KUMAR, V., SHARMA, S. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of cytoplasmic male sterile, male fertile lines and hybrids of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R Br.]. **Indian J. Crop Science.** 1, 117–119, 2006.

Legendre, P. e Legendre, L. **Numerical Ecology**, 3rd edition. Elsevier, Amsterdam, 990 pp, 2012.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, New York, v. 6, p. 381-398, 1972.

McDERMOTT, J. M. E; McDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p 353-373, 1993.

MELO, A. T. O.; COELHO, A. S. G.; PEREIRA, M. F.; BLANCO, A. J. V.; FRANCESCHINELLI, E. V. Genética da conservação de *Cabralea canjerana* (vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica na APA Fernão Dias. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.39, n.2, p.365-374, 2015.

MORAES, 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**, vol. 14, n. 2, p. 3509-3524, 2015.

MORI, E. S. **Genética de populações arbóreas: orientações para seleção e marcação de matrizes**. Instituto Florestal. Série Registros, v.25, p.35-44, 2003.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. & KENT, J. "Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities", in **Nature** 403, 2000, pp. 853-8.

NAN, P.; SHI, S.; CHUNJIE, T. ZHONG, Y. Genetic Diversity in *Primula obconica* (Primulaceae) from Central and South-west China as Revealed by ISSR Markers. **Annals of Botany** 91:329 – 333, 2003.

NOROOZISHARAF, A., HATAMZADEHA, A., LAHIJIB, H. S., BAKHSHI, D. Genetic diversity of endangered primrose (*Primula heterochroma* Stapf.) accessions from Iran revealed by ISSR and IRAP markers. **Scientia Horticulturae** 190, 173–178, 2015.

PASCOTTO, M. C. *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez. (Myrsinaceae) como importante fonte alimentar para as aves em uma mata de galeria no interior do Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Zool.** 24, 735–741 (2007).

QIU, Y.; LI, L. WANG, B.; CHEN, Z.; KNOOP, V. GROTH-MALONEK, M.; DOMBROVSKA, O. LEE, J. KENT, L. REST, J. ESTABROOK, G. F. HENDRY, T. A.; TAYLOR, D. W.; TESTA, C. M.; AMBROS, M.; CRANDALL-STOTLER, B.; DUFF, R. J.; STECH, M. FREY, W. QUANDT, D.; DAVIS, C. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. **PNAS**, vol. 103 no. 42, 2006.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REED, D. H.; FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation Biology**, v. 17, p. 230–237, 2003.

SILVA, R. A. R.; ARAÚJO, L. H. B.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Distribuição espacial de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.: uma espécie arbórea dioica em um fragmento de Floresta Atlântica no nordeste do Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p., 2014.

SILVA, C. A. VIEIRA, M. F.; CARVALHO-OKANO, R. M.; OLIVEIRA, L. O. Reproductive success and genetic diversity of *Psychotria hastisepala* (Rubiaceae), in fragmented Atlantic forest, Southeastern Brazil. **Rev. Biol. Trop.** ISSN-0034-7744 Vol. 62 (1): 309-319, March 2014.

SILVEIRA, S. B.; NEVES, E. J. M.; CAPANEZZI, A. A. & BRITZ, R. M. Avaliação silvicultural de *Rapanea ferruginea* e *Citharexylum lummyrianthum* plantadas em pastagens abandonadas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 73, p. 99-102, 2013.

SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F. Assessment genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 26, p. 329-336, 2003.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Rev. bras. plantas med.** vol.17 no.3 Botucatu July/Sept. 2015.

SOUZA, L. B.; RUAS, E. A.; RODRIGUES, L. A.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M. AFLP marker analysis revealing genetic structure of the tree *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) in the southern Brazilian Tropical Rainforest. **Genetics and Molecular Biology**, 36, 4, 533-539, 2013.

THOMSON, J. D. e BARRET, S. C. H. Selection for outcrossing, sexual selection and evolution of dioecy in plants. **The American Naturalist** 118: 443-449, 1981.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Available from: <http://www.tropicos.org> Accessed in 08 Feb 2017.

VENCOVSKY, R., CHAVES, L. J.; CROSSA, J. Variance effective size for dioecious species. **Crop Science**, Madison, v. 52, n. 1, p. 79-90, 2012.

VIANNA, L.S. Caracterização da diversidade genética de duas populações naturais de *Vochysia Bifalcata* Warm no Parque Nacional do Caparaó/ES. **Nucleus**,v.12,n.1,abr. 2015.

WANG, D. Y.; CHEN, Y. J.; ZHU, H.M.; LV, G. S., ZHANG, X.P., SHAO, J.W. Highly differentiated populations of the narrow endemic and endangered species *Primulacicutariifolia* in China, revealed by ISSR and SSR. **Biochemical Systematics and Ecology** 53, 59–68, 2014.

WRIGHT S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics** 15:323-354, 1951.

YIN, Y.; LIU, Y.; LI, H.; ZHAO, S.; WANG, S.; LIU, Y.; WU, D.; XU, F. Genetic Diversity of *Pleurotus pulmonarius* Revealed by RAPD, ISSR, and SRAP Fingerprinting. **CurrMicrobiol** 68:397–403, 2014.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 11, n. 10, p. 413-418, 2001.