

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

LILIANA APARECIDA RIBEIRO MARTINS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Dorstenia elata* Hook. (MORACEAE)
EM UM REMANESCENTE DE FLORESTA ATLÂNTICA**

ALEGRE, ES

2016

LILIANA APARECIDA RIBEIRO MARTINS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Dorstenia elata* Hook. (MORACEAE)
EM UM REMANESCENTE DE FLORESTA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Taís Cristina Bastos Soares

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes

ALEGRE, ES

FEVEREIRO – 2016

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

M386d Martins, Liliana Aparecida Ribeiro, 1991-
Diversidade genética de *Dorstenia elata* Hook. (Moraceae) em um fragmento de floresta atlântica / Liliana Aparecida Ribeiro Martins. – 2016.
37 f. : il.

Orientador: Taís Cristina Bastos Soares.
Coorientadores: Milene Miranda Praça Fontes.
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Diversidade genética. 2. *Dorstenia*. 3. Marcadores moleculares.
I. Soares, Taís Cristina Bastos. II. Fontes, Milene Miranda Praça.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 63

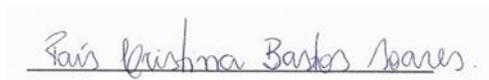
LILIANA APARECIDA RIBEIRO MARTINS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Dorstenia elata* Hook. (MORACEAE)
EM UM REMANESCENTE DE FLORESTA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 02 de fevereiro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Taís Cristina Bastos Soares
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Tatiana Tavares Carrijo
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Fabio Luiz de Oliveira
Universidade Federal do Espírito Santo

A meu pai, João Mariano, por tudo que tem dedicado a mim,

Dedico

"Quando a gente anda sempre em frente, não pode ir muito longe".
Nossas maiores conquistas são alcançadas quando exploramos outras direções
além das que nos colocam na nossa zona de conforto...
(Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela força em superar os obstáculos e pela coragem em seguir em frente.

A Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do Curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, a Fundação de Amparo e Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

A professora Taís Cristina Bastos Soares, pelo voto de confiança, paciência, ensinamentos e orientações dedicados a mim durante todo esse tempo, que me proporcionaram crescer tanto na área acadêmica quanto pessoal.

A professora Milene Miranda Praça Fontes pelos ensinamentos, companheirismo e dedicação, por não medir esforços para meu crescimento profissional e pessoal.

A professora Tatiana Tavares Carrijo, pela disponibilidade da pesquisa, pelos conselhos, ensinamentos e contribuições ao trabalho.

Ao professor Fabio Demolinari de Miranda pelos esclarecimentos, ajudas nas análises e pelas contribuições ao trabalho.

Ao professor Fabio Luiz de Oliveira pela disposição em ajudar e pelas contribuições ao trabalho.

A Carla Cristina Rosado pela ajuda na condução do trabalho, e esclarecimentos e pelo companheirismo.

Ao Rodrigo Monte Lorenzoni, por toda dedicação, colaboração na pesquisa em geral e sobretudo pela amizade e confiança que nos une em laço de irmãos.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Ronald, Cássio, Franciele, Aléxia, Adelson, Lucimara, Maressa e Edilson por tornarem os dias de trabalho mais agradáveis e divertidos e pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, Renata, Paulo, Micheli, Victor, Stefanie, Kati, Lucas, Ariane, Cristiana, Natália e Mel, por serem a minha família, não importando onde eu esteja.

Aos amigos Renan Hollunder, Felipe Torres, Jheniffer Abeldt e Jaqueline Luber pelas ajudas em campo, esclarecimentos com relação ao trabalho e pela disposição em me oferecer ajuda a qualquer momento.

Ao meu pai, João Mariano, por ser o meu apoio, meu suporte e meu guia, e por fazer de cada luta uma conquista e sempre caminhar ao meu lado.

A minha irmã Leidiane, pelo apoio, por ser meu braço direito e esquerdo em todos os momentos que precisei, e pela disponibilidade de seus dois amigos, Darlan e Robson, em não me deixarem desamparada em nenhum momento.

A minha mãe Marli, minhas Irmãs Juniana e Leiliane, minhas tias Ilda e Zinma e Minha querida avó Evelina e Tia Tide (*in memoriam*) pela dedicação e carinho em minha criação, pelos conselhos e por estarem sempre presentes em todos os momentos possíveis.

Aos meus sobrinhos Arthur e Antonella pela alegria que me proporcionam a cada dia e por me ensinarem a ser uma pessoa melhor.

Aos meus amigos que me acompanham nessa caminhada, Paula Mauri, Vinicio, Stephanie, Jaqueline, Lucas Mendes, por me escutarem a todos os momentos, e por estarem sempre presentes.

A todos mais que, de alguma maneira, fizeram parte desta jornada.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Liliana Aparecida Ribeiro Martins, filha de João Mariano Martins e Marli Ribeiro Martins, nasceu em Iúna, Espírito Santo, no dia 11 de outubro de 1991. Em agosto de 2009, ingressou na Universidade Federal do Espírito Santo, graduando-se Licenciada em Ciências Biológicas em fevereiro de 2014. Durante o período de graduação, foi monitora do Departamento de Biologia e bolsista do PIBIC/CNPq durante 3 anos, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Cultura de Tecidos Vegetais. Em março de 2014, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, atuando na área de Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Taís Cristina Bastos Soares e Coorientação da Prof.^a Dr.^a Milene Miranda Praça Fontes, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2016.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2. OBJETIVOS..... | 18 |
| 2.1 Objetivo geral | 18 |
| 2.2 Objetivos específicos. | 18 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 19 |
| 3.1 Área de estudo e material vegetal..... | 19 |
| 3.3 Análise de ISSR | 22 |
| 3.4 Análises estatísticas..... | 22 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 4.1. Diversidade Intrapopulacional..... | 24 |
| 4.2 Diversidade Interpopulacional | 28 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 33 |
| 5 REFERÊNCIA..... | 34 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Localização do Parque Estadual Mata das Flores no município de Castelo - ES. Fonte: MARTINS, G.G.K. | 19 |
| Figura 2 - <i>Dorstenia elata</i> . Fonte: Barreto, L. M. | 20 |
| Figura 3 - Bloco florestal 1 - Parque Estadual Mata das Flores, Castelo - ES. Fonte: Google earth..... | 20 |
| Figura 4 – Dendograma obtido pelo método UPGMA baseado nas distâncias genéticas expressas pelo coeficiente de Jaccard para três populações de <i>Dorstenia elata</i> . G1 = grupo 1 (chave vermelha); G2= Grupo 2 (chave azul)..... | 27 |
| Figura 5 – Análise de agrupamento hierárquico pelo método de Ligação simples – Vizinho mais próximo, com base nos dados obtidos por marcadores ISSR em <i>Dorstenia elata</i> | 30 |
| Figura 6 – Gráfico de barras mostrando os dois grupos genéticos identificados pela análise (k=2). Grupo 1 – vermelho; Grupo 2 – Verde. Os números 1, 2 e 3 correspondem aos agregados de indivíduos coletados..... | 31 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Coordenadas geográficas e número de indivíduos (n) das populações de <i>D. elata</i> amostradas | 21 |
| Tabela 2 - Componentes do tampão de extração com suas respectivas concentrações de uso. | 21 |
| Tabela 3 – Marcadores ISSR utilizados na amplificação de <i>Dorstenia elata</i> | 24 |
| Tabela 4 - Distâncias geográficas entre as subpopulações de <i>Dorstenia elata</i> | 26 |
| Tabela 5 - Análise de variância molecular entre as três populações de <i>Dorstenia elata</i> | 28 |

MARTINS, Liliana Aparecida Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, fevereiro de 2016. Diversidade genética de *Dorstenia elata* L. (Moraceae) em um remanescente de floresta atlântica. Orientadora: Dr^a. Taís Cristina Bastos Soares. Coorientadora: Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes.

RESUMO

Dorstenia é o segundo maior gênero da família Moraceae, contendo espécies endêmicas com qualidades medicinais e interesse farmacêutico. No Brasil, estão distribuídas entre os diversos biomas, inclusive na Floresta Atlântica, e são consideradas *hotspot* da biodiversidade (elevado nível de biodiversidade, endemismo e alto grau de degradação). Contudo, devido a ação humana, esta floresta vem tendo sua estrutura modificada, causando a redução da densidade entre as espécies, afetando o modo de reprodução, polinização e distribuição do fluxo gênico entre e dentro de populações. Estes fatos podem levar a uma diminuição da diversidade genética. Assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a diversidade genética entre e dentro de populações de *Dorstenia elata* em um remanescente de Floresta Atlântica no estado do Espírito Santo. Foram coletados três agregados de indivíduos de *D. elata* no Parque Estadual Mata das Flores (Unidade de Conservação), no município de Castelo. Para a caracterização molecular, foram utilizados 12 primers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), onde os dados obtidos foram analisados e submetidos à análises estatísticas referentes a diversidade entre e dentro de populações. Para análises intrapopulacionais, foi calculada a matriz de distância entre pares de indivíduos, realizada o cálculo da correlação cofenética e gerado um dendrograma de agrupamento das populações, que evidenciaram a formação de dois grupos, o primeiro contendo a população 1 e 2, e o segundo contendo a população 3. Isto pode ter ocorrido em virtude da distância geográfica entre as populações amostradas. Para as análises interpopulacionais, foi realizada a análise de variância molecular, calculado o Índice de Shannon, a heterozigosidade total esperada e o fluxo gênico. De acordo com os resultados obtidos, a maior variabilidade genética foi observada dentro das populações, e o fluxo gênico foi alto tanto entre quanto dentro de populações, indicando que não está havendo perda de diversidade genética devido as barreiras antrópicas ou geográficas, e que o método de dispersão tem grande influência na distribuição da diversidade genética em populações de *Dorstenia elata*.

Palavras-chave: diversidade genética, *Dorstenia*, *caiapiá*, ISSR.

MARTINS, Liliana Aparecida Ribeiro, M.Sc., Federal University of Espírito Santo, february 2016. Genetic diversity of *Dorstenia elata* L. (Moraceae) in a forest atlantic remaining. Adviser: Dr^a. Taís Cristina Bastos Soares. Coadvisers: Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes.

ABSTRACT

Dorstenia is the second largest genus of the Moraceae family, containing endemic species with medicinal qualities and pharmaceutical interest. In Brazil, they are distributed among the various biomes, including in the Atlantic Forest, considered hotspot biodiversity (high level of biodiversity, endemism and high degree of degradation). However, due to human action, this forest has had its modified structure, causing a reduction in density between species, affecting the playback mode, pollination and distribution of gene flow between and within populations. These facts can lead to a reduction of genetic diversity. The objective of this study was to characterize the genetic diversity among and within populations *Dorstenia elata* in a remaining of Atlantic Forest in the state of Espírito Santo. Three aggregates tin from individuals of *D. elata* were collected in the State Park Mata das Flores (Conservation Unit) in the county Castelo. For molecular characterization, 12 ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) primers were used, where the data were analyzed and submitted to analysis statistics for diversity among and within populations. For intrapopulation analysis was calculated the distance matrix between pairs of individuals, carried out the calculation of cophenetic correlation and generated a cluster dendrogram populations, which showed the formation of two groups, the first containing the populations 1 and 2 and the second containing the 3 population. This may have occurred because of the geographical distance between the sampled populations. For interpopulation analysis, was performed the analysis of molecular variance, calculated the Shannon Index, the total expected heterozygosity and gene flow. According to the results, the greatest genetic variability was sheltered within populations, and gene flow was high both among and within populations, indicating that it is there is no loss of genetic diversity due to anthropogenic or geographical barriers, and that the method dispersion has great influence on the distribution of genetic diversity in populations of *Dorstenia elata*.

Keywords: genetic diversity, *Dorstenia*, ISSR.

1. INTRODUÇÃO

Moraceae é uma família de angiospermas cosmopolita, distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo e sendo incomuns em climas temperados. Apresenta aproximadamente 50 gêneros e 1.500 espécies (Souza, Lorenzi 2005; Balestrin *et al.*, 2008). No Brasil é representada por 19 gêneros e 203 espécies, os quais exibem hábitos arbóricolas, arbustivos e herbáceos (Romaniuc-Neto *et al.*, 2016).

O gênero *Dorstenia* é o segundo maior desta família, apresentando hábitos herbáceos e suas populações muitas vezes tendem a ocupar áreas restritas com nichos ecológicos favoráveis (Santos e Neto, 2012). O Brasil possui 39 espécies, sendo a maioria endêmicas (Romaniuc-Neto *et al.*, 2016), diferindo das outras pertencentes a família Moraceae tanto pelas suas características morfológicas como pela sua distribuição geográfica (Misiewicz e Zerega, 2012).

As plantas deste gênero são popularmente conhecidas como caapiá, caiapiá, carapiá, contra-ervas ou figueiras terrestres (Carauta, 1978; Pio-corrêa, 1984; Araújo, 2008). Dados que apontem sobre a polinização das espécies do gênero *Dorstenia* são escassos na literatura. Berg (2001) e Araújo (2008) relatam a visita de pequenos insetos nas inflorescências, sugerindo entomofilia. A dispersão dos frutos é realizada de forma autocórica, ou seja, os diásporos de *Dorstenia* são dispersos pela gravidade, próximos aos seus genitores (Judd *et al.*, 2002)

Os estudos científicos deste gênero são restritos e recentes, tendo como foco a análise fitoquímica (Abegaz *et al.*, 2000; Dall'stella, 2008). Tais plantas apresentam constituição química bastante variável, sendo fonte de produtos naturais como cumarinas, terpenos, esteróides, chalconas, flavonas e flavonoides (Santos *et al.*, 2011)

Muitas espécies do gênero *Dorstenia* tem valor medicinal significativo em vários países como na Etiópia, México, Panamá, Tanzânia e inclusive no Brasil. São utilizadas como remédio contra picada de cobra por conter terpenóides, contra tosse e bronquite, no tratamento de feridas e infecções gerais, infecções oculares, gota, e no Brasil comumente é utilizada para tratamento de dermatites, devido a presença de furanocumarinas (Abegaz *et al.*, 2000).

O rizoma possui grande quantidade de metabólitos secundários e pode ser utilizado como emético, diurético, tônico, purgativo, vomitivo, para combate a

diarreias crônicas, disenterias e também para acelerar a consolidação de fraturas (Peckolt e Peckolt, 1888), ou na aromatização de fumo para cachimbo (Mendonça e Lins, 2000). Dessa forma, ocorre a retirada da planta inteira do meio ambiente, levando a uma exploração irrestrita em larga escala, a fim de atender as demandas das indústrias farmacêuticas que vem sendo cada vez maior (Raomai *et al.*, 2014).

No Brasil, estas espécies deste gênero estão distribuídas entre os diversos biomas, Floresta Amazônica, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Floresta Tropical Atlântica, com a maioria ocorrendo em clima tropical, sendo estes locais considerados hotspots da biodiversidade, devido ao seu alto grau de endemismo e elevado nível de biodiversidade, assim como altas taxas de degradação (Boeni e Singer, 2014).

A Floresta Tropical Atlântica ocupa uma área de 1.110.182 Km², que abrange a fachada oriental do Brasil e grande parte da Bacia do Paraná (Ribeiro *et al.*, 2009) sendo caracterizada por apresentar grande densidade, heterogeneidade e diversidade (Morais *et al.*, 2012). Esta floresta está restrita a 10,5% do território do Espírito Santo, que originalmente contava com 100% de sua superfície coberta por Mata Atlântica (Fundação SOS Mata Atlântica, 2011). Apresenta-se em fragmentos florestais intercalados com ambiente urbano, o que facilita o acesso humano e conseqüentemente favorece o aumento do desmatamento nestas áreas (Fahrig, 2003).

Esta ação humana vem modificando a estrutura das florestas tropicais, causando a redução da densidade entre espécies, e afetando a reprodução, a polinização e a distribuição do fluxo gênico entre e dentro das populações, devido ao aumento do grau de isolamento espacial (Sebben *et al.*, 2011), formando então fragmentos florestais.

A fragmentação florestal pode ser definida como um processo durante o qual uma grande extensão do habitat é transformada em uma série de pequenas manchas isoladas uma das outras devido a presença de barreiras tanto naturais, como tipos de solo, formações rochosas e vegetais, ou antrópicas como hidrelétricas, estradas ou ocupações rurais e urbanas (Fahrig, 2003).

O processo de fragmentação pode levar a uma perda de diversidade genética devido a diminuição do tamanho das populações, (Viegas *et al.*, 2011). Este processo leva também a redução da variabilidade genética entre populações ou espécies com o aumento do cruzamento entre indivíduos aparentados, o que

compromete a evolução natural das espécies e reduz a capacidade de adaptação das mesmas às mudanças ambientais (Young e Boyle, 2000).

Estudos relacionados a diversidade genética em populações naturais avaliam e quantificam a distribuição da variabilidade genética no tempo e no espaço. O conhecimento desta distribuição entre populações naturais permite um melhor entendimento de como a seleção está atuando em função da adaptabilidade, pois quanto maior a variabilidade genética existente na população, maior é a chance de perpetuação da espécie (Estopa *et al.*, 2006).

A variabilidade genética dentro de uma população pode ser avaliada através do número e porcentagem de genes polimórficos na população; pelo número de alelos de cada gene polimórfico e pela proporção de loci heterozigotos por indivíduo. Os métodos proteicos e métodos moleculares mensuram a variação genética diretamente, dando uma clara indicação dos níveis de variação genética presente na espécie ou na população em estudo. Os marcadores moleculares são utilizados para destacar as diferenças da sequência nucleica entre diferentes indivíduos, que são ditas como polimorfismos. Essas diferenças podem ser inserções, deleções, translocações, duplicações e mutações pontuais (Mondini *et al.*, 2009).

Os marcadores moleculares permitem uma acurada e rápida identificação das variedades, e se tornaram uma ferramenta eficiente para a caracterização de germoplasma de culturas e para o melhoramento (Preczenhak, 2013). Os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) são usados com grande frequência para análise de *fingerprinting* e caracterização das variedades, assim como acessos de germoplasmas de culturas de diferentes espécies, sendo que estes marcadores podem ser utilizados sem informação prévia do genoma da cultura que será analisada (Maritano *et al.*, 2010).

Marcadores moleculares ISSR são baseados na amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de DNA, e tem sido amplamente utilizados para estudos genéticos populacionais sobre várias espécies (Trindade *et al.*, 2012). São marcadores dominantes, logo não diferenciam os indivíduos heterozigotos dos homozigotos dominante, no entanto, tem a vantagem de analisar locus múltiplos em uma única reação (Goulão e Oliveira, 2001).

Estes marcadores consistem em motivos de repetição (microsatélites) que são abundantes e dispersos ao longo do genoma, possuem ampla reprodutibilidade,

maior polimorfismo quando comparado a outros marcadores dominantes, como o RAPD, e são mais informativos. O comprimento dos *primers* de ISSR (15 a 30 nucleotídeos) permite a utilização de elevadas temperaturas de anelamento, o que reflete em uma maior estabilidade no processo de amplificação e o custo das análises é relativamente baixo em comparação com outros marcadores tais como RFLP, SSR e AFLPs (Wang *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade genética entre e dentro de populações de *Dorstenia elata*.

2.2 Objetivos específicos.

Conhecer o fluxo gênico dentro da espécie.

Analisar a influência da distância geográfica no cruzamento entre indivíduos desta espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e material vegetal

O material vegetal utilizado neste estudo foi coletado no Parque Estadual de Mata das Flores (PEMF Unidade de Conservação) que se localiza adjacente à área urbana do Município de Castelo, Espírito Santo (35' 54" S e 41°10' 53" W) (figura 1).

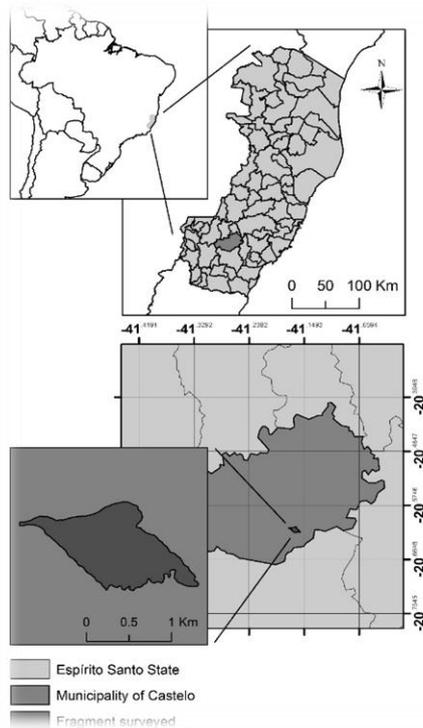


Figura 1 - Localização do Parque Estadual Mata das Flores no município de Castelo - ES. Fonte: MARTINS, G.G.K.

O PEMF possui área aproximada de 800 ha de floresta ombrófila densa montana e estacional semidecidual e foi criado em janeiro de 1992 pela Lei estadual nº 4617 (IEMA, 2013).

Foram realizadas excursões a campo em busca de agregados de indivíduos de *Dorstenia elata* (figura 2), de forma exploratória, nas áreas visualizadas na figura 3. A espécie é rara e endêmica, e possui um padrão de distribuição espacial agregada, sendo que cada agregado de indivíduos foi considerado neste trabalho como uma subpopulação da espécie.



Figura 2 - *Dorstenia elata*. Fonte: Barreto, L. M.

Amostras de folhas de indivíduos saudáveis foram coletadas e armazenadas em sacos de papel previamente identificados e contendo sílica. As folhas foram levadas ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias da UFES, onde foram armazenadas para realização das análises. Foram avaliadas três subpopulações, totalizando 65 indivíduos (tabela 1).

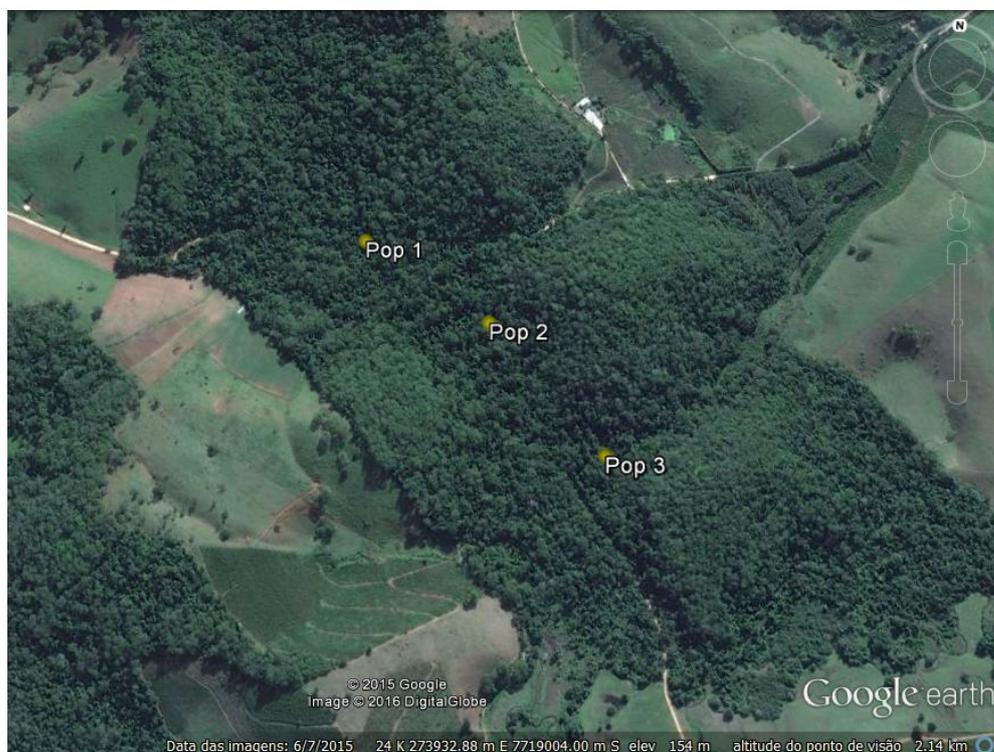


Figura 3 - Bloco florestal 1 - Parque Estadual Mata das Flores, Castelo - ES. Fonte: Google earth.

Tabela 1 - Coordenadas geográficas e número de indivíduos (n) das populações de *D. elata* amostradas

| Agregados | Latitude | Longitude | N |
|-----------|---------------|----------------|----|
| SubPop 1 | 27°38'45.93"S | 77°19'30.51"O | 22 |
| SubPop 2 | 27°41'05.84"S | 77°19'14.57"O | 21 |
| SubPop 3 | 27°43'45.07"S | 77° 18'89.54"O | 21 |

3.2 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Doyle & Doyle (1990), com algumas modificações propostas pelo IAC (Instituto Agrônomo de Campinas).

Inicialmente cerca de 200mg de folhas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, e o pó obtido foi transferido para microtubos de 2 mL previamente identificados. Rapidamente foram acrescentados 700 µL de tampão de extração (tabela 2) e o tubo agitado em vórtex, em seguida foram acrescentados mais 700 µL de tampão, seguido de nova agitação para total homogeneização. Posteriormente os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 40 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos.

Após o término da incubação, foi realizada uma centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, onde ocorreu a formação de duas fases, sendo o sobrenadante então transferido para novos tubos de 2 mL e acrescentado 660 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), em seguida os tubos foram agitados durante 5 minutos por meio de inversões manuais e foram novamente centrifugados a 12000 rpm por 12 minutos. Foi realizada uma nova transferência de sobrenadante para um tubo de 1,5 mL e feita uma adição de 600 µL de álcool isopropílico gelado.

Posteriormente foi realizada uma nova centrifugação por 15 minutos a 12000 rpm. O precipitado formado foi lavado três vezes com 500 µL de etanol 70%. O álcool foi descartado e o pellet deixado em temperatura ambiente por 15 minutos para secagem. Por fim o DNA foi ressuspenso em TE+RNAase incubados a 37 °C. A concentração e qualidade foi estimada através de quantificação em Nanodrop.

Tabela 2 - Componentes do tampão de extração com suas respectivas concentrações de uso.

| Reagente | Concentração |
|----------|--------------|
|----------|--------------|

| | |
|------------------|-----------|
| NaCl | 1,4 mol/L |
| Tris-HCl pH 8,0 | 100mmol/L |
| EDTA pH 8,0 | 20mmol/L |
| PVP | 1% |
| CTAB | 2% |
| B-mercaptoetanol | 0,2% |
| Água mili-q | - |

3.3 Análise de ISSR

Um total de 25 *primers* ISSR foram utilizados. As reações de amplificação foram realizadas em placas para PCR, tendo como volume final 20 µL por amostra, contendo: 30 ng de DNA; 0,25 µmol/L de cada dNTP; 0,2 µmol/L de *primer*; 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8,5); 2,4 mmol/L de MgCl₂; 0,2 U de Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems Veriti™.

O programa utilizado para a amplificação dos fragmentos consistiu das seguintes etapas: uma desnaturação a 94° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 45 segundos (desnaturação), 52° C por 45 segundos (anelamento) e 72 ° C por 90 segundos (extensão), e ao final dos 35 ciclos, uma extensão final a 72° C por 7 minutos, e resfriamento a 4 ° C.

Os produtos da amplificação foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 2,5% numa voltagem de 100 Volts por 4 horas. Após a separação dos fragmentos, o gel foi corado com brometo de etídio na concentração de 0,25 µg/mL e em seguida exposto à luz ultravioleta e fotografado em fotodocumentador Biorad® Gel Doc XR System.

3.4 Análises estatísticas

As tabulações dos dados moleculares foram feitas a partir das bandas polimórficas detectadas nos géis para cada espécie/população. Os produtos amplificados foram avaliados como presença (1) ou ausência (0) de bandas e então gerada uma matriz binária. Só foram considerados os fragmentos facilmente identificados.

A partir dessa matriz foi gerado o coeficiente de Jaccard, que foi utilizado para calcular a dissimilaridade genética entre os indivíduos. As médias das dissimilaridades genéticas foram utilizadas para a análise de agrupamento dos

indivíduos, pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Average*). A correlação cofenética foi realizada para verificar a confiabilidade dos dados entre as matrizes de dissimilaridade e os dados gráficos de agrupamento. Todas as análises acima foram realizadas utilizando o programa GENES (Cruz, 2013). Foi realizada ainda a análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) para estimativa da variância dentro e entre as populações, com o auxílio do programa Arlequin, versão 3.11.

O índice de diversidade de Shannon foi estimado através do programa POPGENE versão 1.32 (Young *et al.*, 2000). Foram utilizados parâmetros para dados diploides dominantes, onde a estatística de variação genética para cada população foi calculada de acordo com Nei (1987). Tendo em vista a natureza dominante dos dados, esse programa pressupõe, para os cálculos das estimativas das frequências alélicas, que os locos estejam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi realizada também a análise de diversidade genética em populações pelo método de Nei (1987), estimada a heterozigosidade total (H_T), diversidade genética média (H_S) e fluxo gênico (Nm).

O agrupamento Bayesiano foi realizado utilizando o software Structure (Pritchard *et al.*, 2000). O programa foi executado para 10.000 interações, para testar a subdivisão populacional de $k=1$ para $k=6$, e assim, verificar qualquer possível subdivisão. Vinte corridas foram realizadas para cada valor de k . O número de grupos genéticos foi estimado pelo valor DK (Evanno *et al.*, 2005), utilizando o software Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Diversidade Intrapopulacional

Entre os 25 *primers* ISSR testados avaliar a diversidade genética em *Dorstenia elata* (tabela 3), foram selecionados os 12 mais polimórficos. O número de fragmentos por iniciador variou entre 3 (UBC 811 – Pop 1) a 13 (UBC 808 – Pop 3), mas, em média, foram obtidas 7,9 bandas. Os marcadores ISSR oferecem um método rápido e confiável para a geração de dados genéticos referente a populações (Chen *et al.*, 2014), e neste estudo, o número de bandas amplificadas pelos 12 *primers* possibilitaram a obtenção de 119 fragmentos amplificados.

Tabela 3 – Marcadores ISSR utilizados na amplificação de *Dorstenia elata*

| <i>Primers</i> | Sequência (5' → 3') | Número de fragmentos polimórficos | | |
|----------------|-------------------------|-----------------------------------|-------|-------|
| | | Pop1 | Pop 2 | Pop 3 |
| UBC 807 | AGA GAG AGA GAG AGA GT | 7 | 8 | 12 |
| UBC 808 | AGA GAG AGA GAG AGA GC | 8 | 6 | 13 |
| UBC 810 | GAG AGA GAG AGA GAG AT | 5 | 4 | 11 |
| UBC 811 | GAG AGA GAG AGA GAG AC | 3 | 4 | 12 |
| UBC 813 | CTC TCT CTC TCT CTC TT | 6 | 6 | 11 |
| UBC 824 | TCT CTC TCT CTC TCT CG | 6 | 8 | 12 |
| UBC 825 | ACA CAC ACA CAC ACA CT | 9 | 9 | 9 |
| UBC 840 | GAG AGA GAG AGA GAG AYT | 7 | 6 | 8 |
| UBC 842 | AG AGA GAG AGA GAG AYT | 4 | 6 | 9 |
| UBC 845 | CTC TCT CTC TCT CTC TRA | 8 | 8 | 9 |
| UBC 854 | TCTCTCTCTCTCTCRG | 7 | 7 | 9 |

Em estudos de melhoramento genético, quantificar o grau de dissimilaridade entre linhagens, variedades ou espécies tem sido importante para detecção de parentesco ou de acessos promissores para constituição de híbridos, assim como para avaliação do fluxo gênico ao longo do tempo. As medidas de dissimilaridade

têm sido propostas para verificar o grau de similaridade e a variação genética entre espécies ou populações, comparando pares de indivíduos e gerando uma matriz capaz de proporcionar uma classificação das populações estudadas (Cruz, 2011).

De acordo com o complemento aritmético de Jaccard na matriz de dissimilaridade, os indivíduos 12 (Pop 1) X 52 (Pop 3) foram os mais divergentes (CD = 0.86957) e os indivíduos 35 (Pop 2) X 36 (Pop 2) os mais próximos (CD=0.07843).

Calculou-se também o Coeficiente de Correlação Cofenética, que fornece uma correlação entre a matriz de dissimilaridade e o dendograma gerado. Esta evidenciou uma associação de 87,15% (CCC = 0,8715) entre as distâncias obtidas na matriz de dissimilaridade (complemento de Jaccard) e a matriz cofenética. O valor encontrado foi satisfatório, visto que valores superiores a 0,56 refletem boa concordância entre as matrizes (Vaz Patto *et al.*, 2004)

As bandas obtidas no presente estudo por meio dos marcadores ISSR também foram utilizadas para a construção de um dendograma baseado no agrupamento UPGMA, usando as distâncias genéticas entre os pares de indivíduos (figura 4). Este apresentou dois grupos, o primeiro contendo a população 1 e 2 e o segundo contendo a população 3. O ponto de corte foi definido por meio do coeficiente de Mojema (1977).

A quantidade de fragmentos polimórficos gerados pelos *primers* nesse estudo pode ser considerada suficiente para a avaliação da diversidade genética na espécie, uma vez que, de acordo com o coeficiente de correlação cofenética, existe uma boa correlação entre a matriz de dissimilaridade e o dendograma gerado.

Com base na matriz de dissimilaridade e no dendograma gerado, foi possível inferir que as populações 1 e 2 apresentaram maior similaridade, o que indica maior fluxo gênico entre essas populações. Já os indivíduos mais distantes foram entre representantes das populações 1 e 3, o que indica uma menor similaridade entre elas, e conseqüentemente, um menor fluxo gênico.

Estopa *et al.*, (2006), ao estudar a diversidade genética em duas populações naturais de candeia (*Eremanthus erythopappus* (DC.) MacLeish) por meio de marcador RAPD demonstraram que a distância genética pode ser influenciada pela distância geográfica, isto pode estar associado a distribuição dos indivíduos nas áreas, em virtude do modo de dispersão. No presente estudo, a distância geográfica influenciou no cruzamento dos indivíduos entre os agregados, sugerindo que, quanto

mais próximas geograficamente as subpopulações estiverem, menor a distância genética entre elas (tabela 4).

Tabela 4 - Distâncias geográficas entre as subpopulações de *Dorstenia elata*

| Populações | Distância |
|---------------|-----------|
| Po1 X Pop 2 | 280 m |
| Pop 2 X Pop 3 | 334 m |
| Pop 1 X Pop 3 | 621 m |

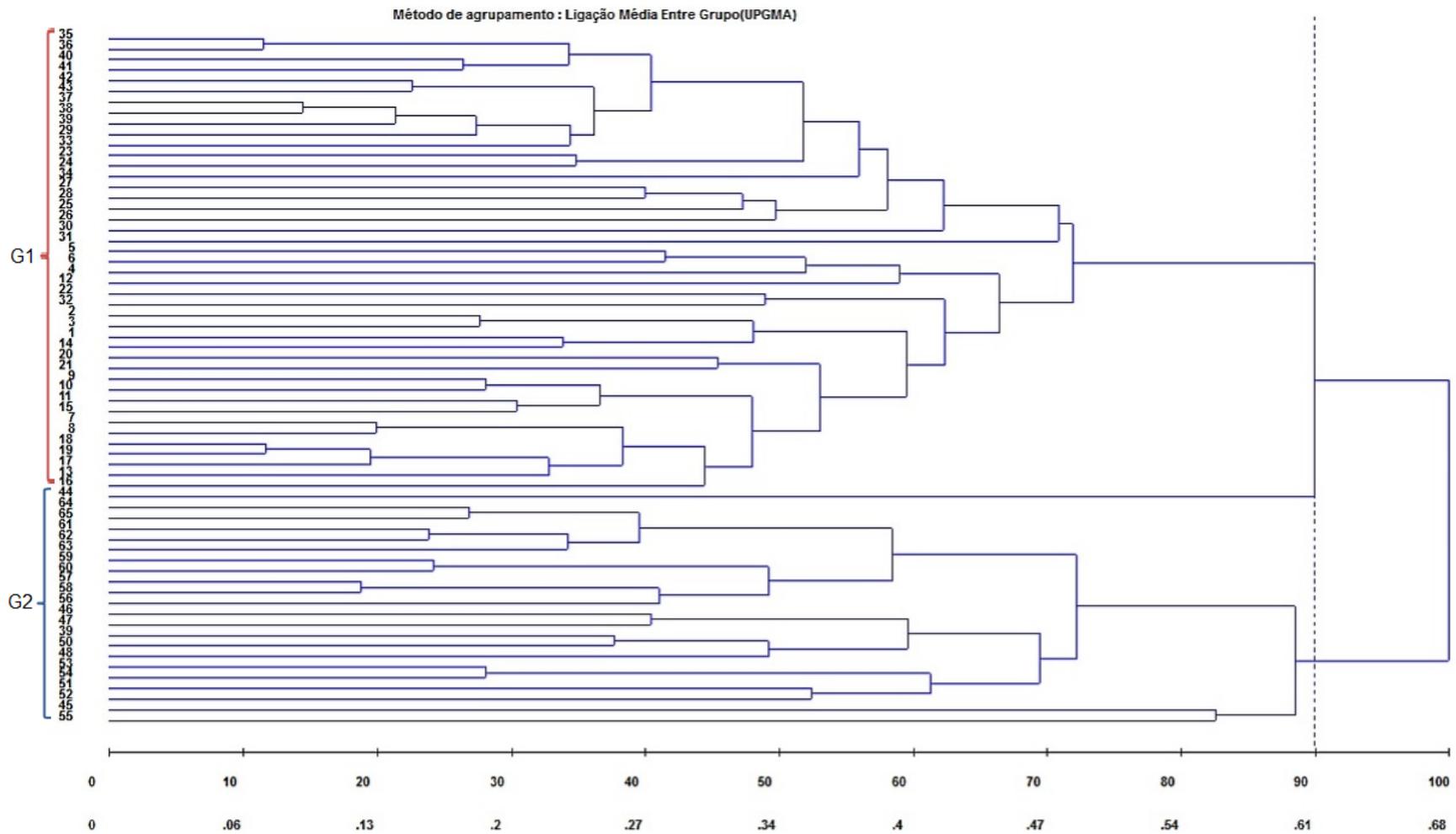


Figura 4 – Dendrograma obtido pelo método UPGMA baseado nas distâncias genéticas expressas pelo coeficiente de Jaccard para três populações de *Dorstenia elata*. G1 = grupo 1 (chave vermelha); G2= Grupo 2 (chave azul).

O índice de Shannon variou de 0,456 a 0,6931 entre as populações, com uma média de 0,5106. De acordo com Pádua (2011), o valor do Índice de Shannon varia entre 0 e 1, considerando que, quanto maior o valor encontrado, maior será a diversidade. As populações amostradas em áreas que podem ser mais afetadas pela ação antrópica (Pop 1 e 2), uma vez que se localizam em regiões de fácil acesso, apresentaram valores de diversidade genética mais baixos, 0,3169 e 0,3466, respectivamente, quando comparadas a 3 população, com índice de Shannon de 0,4841.

4.2 Diversidade Interpopulacional

Por meio da AMOVA, foi realizada a partição da variação genética em dois níveis: dentro de populações e entre populações (tabela 5).

Tabela 5 - Análise de variância molecular entre as três populações de *Dorstenia elata*

| Componente de variância | Estimativa | % |
|-------------------------|------------|---------|
| Entre | 10.4925 | 42.4748 |
| Dentro | 14.2104 | 57.5252 |
| Total | 24.7029 | 100 |
| Estatística ϕ_{ST} | 0.4247 | 42,47 |

O valor de diferenciação genética entre as populações ϕ_{ST} foi 0,4247, indicando alta diferenciação genética entre as populações. Logo, 57,52% da variação foi atribuída à diversidade dentro das populações, e o restante, 42,47%, à diversidade entre populações. Estes resultados indicam que as populações em estudo são mais divergentes dentro delas, e mais similares entre as mesmas.

Segundo Frankham *et al.*, (2012), valores de ϕ_{ST} maiores que 0,15 geralmente indicam fragmentação da população, e quanto maior esse valor, menor é a capacidade de dispersão, aumentando a probabilidade destas populações se tornarem endogâmicas. O endocruzamento e a perda da diversidade genética são inevitáveis em pequenas populações, pois em curto prazo, a reprodução é reduzida, assim como a sobrevivência. Isto leva a consequências a longo prazo, podendo

causar uma diminuição na capacidade de evolução em resposta a mudanças ambientais.

A determinação da estrutura genética de uma população depende de fatores ecológicos e da dispersão dos seus genes. O processo reprodutivo é um dos responsáveis por manter um padrão genético para as subseqüentes gerações, enquanto a dispersão do pólen e sementes determinam os padrões de dispersão dos genes dentro e entre populações (Loveless e Hamrick, 1984).

Assim, a divergência entre as populações é reduzida com o aumento do fluxo alélico, realizado via pólen e, ou sementes. A polinização de *Dorstenia* é entomofílica, realizada principalmente por moscas ou vespas (Berg, 2001), e a dispersão dos diásporos é autocórica. Logo, este estudo sugere que a polinização seja mais responsiva em detrimento da dispersão dos frutos de *Dorstenia elata* no que se refere à variabilidade entre as populações naturais estudadas. Tem-se que a polinização seja o agente responsável pela conexão das populações, dado à impossibilidade de dispersão a longa distância desses diásporos. Estes resultados mostram a importância da interligação dos fragmentos florestais, a fim de manter a variabilidade genética da espécie.

A diversidade genética de Nei (1987) foi de 0.2467 ($G_{ST}=0.24$) entre as populações, podendo inferir que a variabilidade amostrada contribui com 14% para a heterozigosidade total, sendo então 75% da variabilidade genética distribuída dentro das populações. O dendrograma obtido através das similaridades genéticas é apresentado na figura 5.

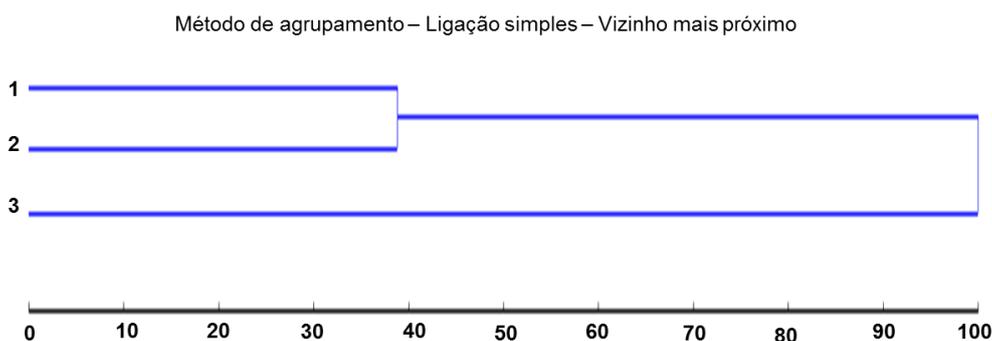


Figura 5 – Análise de agrupamento hierárquico pelo método de Ligação simples – Vizinho mais próximo, com base nos dados obtidos por marcadores ISSR em *Dorstenia elata*.

Foi possível evidenciar a separação dos indivíduos em dois grupos, um contendo as subpopulações 1 e 2 e um segundo grupo contendo a subpopulação 3, demonstrando que a distância geográfica pode estar influenciando na distribuição dos indivíduos na área de estudo.

Matematicamente, a estatística é equivalente ao valor de ϕ_{ST} , podendo ser aplicada a diferentes níveis de classificação hierárquica, como populações dentro de uma região geográfica ou subpopulações dentro de populações, como no presente estudo. Apesar da diferença de valores encontrados nas duas análises, ambas mostram que a maior parte da variabilidade genética está concentrada dentro das subpopulações.

Segundo Wright (1951), valores de ϕ_{ST} que correspondem ao G_{ST} , de 0,00 a 0,5 indicam baixa diferenciação genética, valores de 0,05 a 0,15 indicam diferenciação genética média e valores acima de 0,15 indicam alta diferenciação genética. Os valores de diferenciação genética encontrados no presente trabalho podendo ser considerados altos suficientes para inferir a ocorrência de diferenciação entre populações.

O fluxo gênico estimado entre as populações de *Dorstenia elata* foi de 1,5271, avaliado como um baixo fluxo gênico. Quando o fluxo gênico entre populações ou subpopulações excede quatro migrantes por geração, ocorre a homogeneização dos alelos entre as mesmas, funcionando então como populações panmíticas. Os resultados do presente trabalho mostram que o fluxo gênico não foi suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética, podendo este fato estar relacionado ao isolamento das subpopulações devido à fragmentação florestal.

A divergência genética obtida através das estimativas de G_{ST} para as subpopulações de *Dorstenia elata* sugerem a existência de deriva genética

significativa, uma vez que o valor encontrado foi superior ao encontrado em espécies com sistema reprodutivo alogâmico (11,8%) (Loveless e Hamrick, 1987). Este fato pode ter ocorrido devido as baixas taxas de fluxo gênico entre as subpopulações. Logo, estas podem se enquadrar na situação em que a deriva genética sobrepuja os efeitos do fluxo gênico.

A partição da variação genética das populações foi verificada por agrupamento dos indivíduos em grupos bayesianos. As marcações genéticas encontradas definiram o número correto de grupos, baseando na taxa de mudança no $\ln(k)$, estatística ΔK , indicando uma convergência para 2 grupos bayesianos ($K=2$) (figura 5). As características genéticas obtidas com o marcador molecular ISSR apresentaram os 2 grupos genéticos compartilhados basicamente na mesma proporção para os três agregados, apenas na população 3, um dos grupos teve maior representatividade. Porém não houve formação de um grupo específico para cada localidade (figura 6)

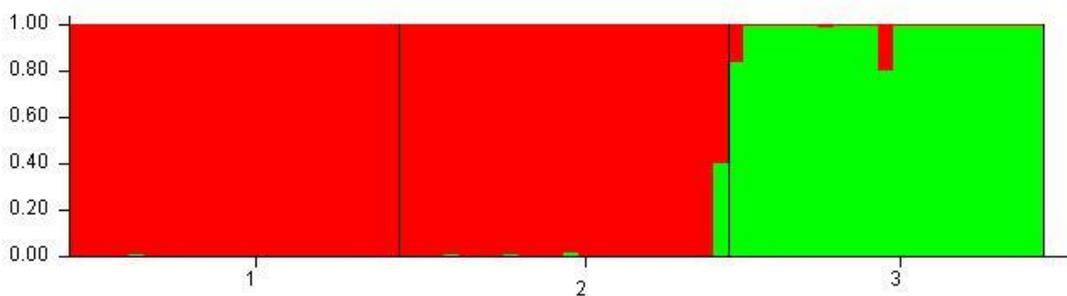


Figura 6 – Gráfico de barras mostrando os dois grupos genéticos identificados pela análise ($k=2$). Grupo 1 – vermelho; Grupo 2 – Verde. Os números 1, 2 e 3 correspondem aos agregados de indivíduos coletados.

Os resultados obtidos com esta análise estão em conformidade com a análise de dissimilaridade genética baseada no método UPGMA e na distância genética de Nei, baseada no método de ligação simples.

De acordo com Zanella *et al.*, (2012), a combinação da distribuição espacial dos indivíduos e o sistema de reprodução, podem influenciar os níveis de diversidade, a homogeneização das populações, e conseqüentemente, aumentar a divergência entre eles.

A maior dissimilaridade foi encontrada entre os indivíduos dos agregados 1 e 2 com o terceiro agregado, concordando com a análise de agrupamento e a partição da variação genética em grupos, sendo também os que tem uma maior distância

física, indicando uma maior diferenciação genética entre as subpopulações 1 e 2 com a terceira subpopulação.

No geral, os resultados obtidos sugerem distinção alta entre as três populações, uma vez que a diferenciação genética entre as populações indicadas por ϕ_{ST} , foi de 0,4247, portanto, pode ser considerado um estado de isolamento total entre estas. Souza *et al.*, (2004) estudando a estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa*, detectou uma elevada quantidade de divergência genética entre populações e concluiu que esta deve ser ligada ao processo fragmentação seguido por desvio genético, o que significa que as populações são isoladas em fragmentos.

4 CONCLUSÕES

Existe diversidade genética entre e dentro das populações de *Dorstenia elata* estudadas, sendo a maior variabilidade genética abrigada dentro das populações, indicando que estas são um reservatório de recursos genéticos conservados *in situ*.

As populações amostradas com menor distância geográfica entre elas (Subpop 1 e 2) mostraram-se mais divergentes, quando comparadas à 3 população estudada, amostrada a uma maior distância.

O marcador ISSR demonstrou ser adequado na análise da diversidade genética de *Dorstenia elata*, identificando altos níveis de polimorfismo inter e intrapopulacional.

O fluxo gênico dentro das populações está presente, contribuindo então para a manutenção da variabilidade e para a manutenção da espécie em seu habitat.

5 REFERÊNCIA

- Abegaz BM, Ngadjui BT, Dongo E, Bezabih MT. (2000). Chemistry of the genus *Dorstenia*. *Current Organic Chemistry*. 4:1079-1090.
- Alam MA, Juraimi, AS, Rafii MY, Hamid AA, Arolu IW, Latif MA. (2015). Genetic diversity analysis among collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions using ISSR markers. *C. R. Biologies*. 338:1-11.
- Almeida CMA, Lima SEM, Lima GSA, Brito JZ, Donato VMTS, Silva MV. (2009). Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. *Ciênc. Agrot.* 33:1771-1776.
- Araujo LM. (2008). Biologia reprodutiva de espécies raras e ameaçadas de extinção de *Dorstenia* L. (Moraceae). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais – Brasil.
- Araújo LM. (2008). Biologia reprodutiva de espécies raras e ameaçadas de extinção de *Dorstenia* L. (Moraceae). Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – Minas Gerais.
- Balestrin L, Dias JFG, Miguel OG, Dall’Stella DSG, Miguel MD. (2008). Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. *Rev. Bras. de Farmacognosia*. 18:230-235.
- Berg CC. (2001). Moreae, Artocarpeae and *Dorstenia* (Moraceae) with introductions to the family and *Ficus* and with additions and corrections to Flora Neotropica monograph 7. *Flora Neotropica Monograph* 83. New York Botanical Garden, New York, USA.
- Boeni BO, Singer RB. (2014). Synopsis of *Dorstenia* (Moraceae) in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 87:925-942.
- Bornet B, Branchard M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19:209-215.
- Carauta JPP. *Dorstenia* L. (1978). (Moraceae) do Brasil e países limítrofes – *Rodriguésia*. Rio de Janeiro. 44:53-223.
- Chagas KPT, Sousa RF, Fajardo CG, Vieira FA. (2015). Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. *Rev. Bras. de Ciências Agrárias*. 10:147-152.
- Chen L, Chen F, He S, Ma L. (2014). High genetic diversity and small genetic variation among populations of *Magnolia wufegensis* (Magnoliaceae), revealed by ISSR and SRAP markers. *Electronic Journal of Biotechnology*. 17:268-274.
- Cruz CD. (2011). Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. *Suprema*. Visconde do Rio Branco – MG.
- Cruz CD. (2013). Programa Genes: Biometria. *Editora UFV*. Viçosa – MG.

Dall'stella DSG. (2008). Estudo fitoquímico aplicado da fração solúvel do extrato etanólico bruto da *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná.

Doyle J and Doyle J (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Earl DA and vonHoldt BM. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4: 359-361.

Estopa RA, Souza AM, Moura COM, Botrel MCG, Mendonça EG, Carvalho D. (2006). Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). *Scientia Florestalis.* 70:97-106.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 131:479-491.

Facanali R, Colombo NCA, Teixeira JPF, Ming LC, Zucchi MI, Marques MOM. (2015). Genetic and chemical diversity of native populations of *Ocimum selloi* Benth. *Indus. Crops and Prod.* 76:249-257.

Fahrig I. Effects of habitat fragmentation on biodiversity (2003). *Ecol. Evol. Syst.* 34:487-515.

Fingolo CE, Santos TS, Vianna-Filho MDM, Kaplan MA. (2013). Triterpene esters: Natural products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). *Molecules.* 18:4247-4256.

Frankham R, Ballou JD, Dudash MR, Eldridge MDB, Fenster CB, Lacy RC, Mendelson JR, Porton IJ, Ralls K, Ryder OA. (2012) Implications of diferente species concepts for conserving biodiversity. *Biological Conservation.* 153:25-31.

Fundação SOS Mata Atlântica, INPA (2011). Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2008-2010. São Paulo.

Goulao L, Oliveira CM. (2001). Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica.* 122:81-89.

Goulão L, Oliveira CM. (2001). Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica,* 122:81-89.

Hamrick JL, Godt MJM. (1990). Alloenzyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL. Plant population genetics, breeding and genetic resources. *Sunderland: Sinauer Associates,* 145-162.

IEMA. Parque Estadual de Mata das Flores. (2013). Disponível em <http://www.meioambiente.es.gov.br/> > Acesso em: 18 Nov.2015.

- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sinauer associates Inc. Publishers. *Sunderland*, Massachusetts – EUA. 2002.
- Loveless MD, Hamrick JL. (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Ver. Ecol. Syst.* 15:65-95.
- Maritano PF, Alderete LM, De la Torre MCP, Escandon AS. (2010). *In vitro* propagation and genetic stability analysis of *Evolvulus* spp. Biotechnological tools for the explorations of native germoplasm with ornamental potential. *In vitro cellualr Development Biology plant.* 46:64-70.
- Misiewicz TM, Zerega NC. (2012). Phylogeny, biogeography and character evolution of *Dorstenia* (Moraceae). *Edinburgh Journal of Botany.* 69(3):413-440.
- Mojema R. (1977). Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *Comp. J.* 20: 359-363.
- Mondini L, Noorani A, Pagnotta MA. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity.* 1:19-35.
- Morais ABB, Lemes R, Ritter CD. (2012). Borboletas (Lepidoptera: Hesperioidea e Papilionoidea) de Val de Serra, região central do Rio Grande do Sul, Brasil. 12:165-183.
- Nei M. (1987). Molecular evolutionary genetics. *Columbia University Press*, New York.
- Pádua JAR. (2011) Genética da paisagem: áreas prioritárias para manejo e a conservação de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish no Estado de Minas Gerais. Lavras: Universidade Federal de Lavras. Dissertação Mestrado. 80 p.
- Pio-corrêa M. (1984). Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal.
- Potts SG, Vulliamy B, Robert S, O'Toole C, Dafni A, Neeman G, Willmer P. (2005) Role of nesting resources in organising diverse bee communities in a Mediterranean landscape. *Ecol Entomol.* 30: 78-85.
- Preczenhak AP. (2013). Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Centro-Oeste. Guarapuava – Paraná.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Raomai S, Kumaria S, Tandon P. (2014). Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of the medicinal plant, *Paris polyphylla* Sm. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 118:445-455.
- Ribeiro MT, Ramos FN, Santos FAM. (2009). Tree structure and richness in Atlantic Forest Fragment: distance from anthropogenic and natural edges. *Revista Arvore.* 33:1123-1132.
- Romaniuc-Neto S, Carauta JPP, Vianna Filho, MDM, Pereira RAS, Ribeiro, JEL da S, Machado AFP, Santos A. dos, Pelissari G, Pederneiras LC. *Moraceae* in *Lista de*

Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB167>>. Acesso em: 01 Jan. 2016.

Santos A, Neto SR. (2012). A new species of *Dorstenia* (Moraceae) from southeastern Brazil. *Phytokeys*. 12:47-51.

Sebbenn AM, Carvalho ACM, Freitas MLM, Moraes SMB, Gaino APSC, Silva JM, Jolivet C, Moraes MLT. (2011). Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. *Heredity*. 106(1):134-145.

Serra BDV, Campos LAO. (2010). Polinização entomófila de abobrinha, *Curcubita moschata* (Curcubitaceae). *Neotropical Entomology*. 39(2):153-159.

Souza LMFI, Kageyama PY, Sebbenn AM. (2004). Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). *Sci. Forestalis* 65: 70-79.

Souza VC, Lorenzi H. (2005). Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora Brasileira, baseado em APG II. *Plantarum*. Nova Odessa.

Sudo GZ, Mendes TCF, Kartnaller MA, Fortes TO, Freitas NFB, Kaplan MAC, Sudo RT. (2010). Sedative and anticonvulsant activities of methanol extract of *Dorstenia arifolia* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 130:9-12.

Trindade H, Sena I, Gonçalves S, Romano A. (2012). Genetic diversity of wild populations of *Tuberaria major* (Cistaceae), an endangered species to the Algarve region (Portugal), using ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 45:49-56.

Valle JS, Fonseca BKD, Nakamura SS, Linde GA, Mattana RS, Ming LC, Colauto NB. (2013). Diversidade genética de populações naturais de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq] por RAPD. *Rev. Bras plantas med.* 15:47-53.

Vaz Patto MC, Satovic Z, Pêgo S, Fevereiro P. (2004). Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. *Euphytica*. 137:63- 72.

Viegas MP, Lacerda C, Petrarolha S, Moreira JP, Toniol L, Azevedo VCR, Campi AY, Freitas ML, Moraes MLT, Sebben AM. (2011). Diversidade genética e tamanho efetivo de duas populações de *Myracroduron rundeuva* Fr. All. Sob conservação ex situ. *Rev. Arv.* 4:769-779.

Wang HW, Fang XM, Ye YZ, Cheng YQ, Wang ZS. (2011). High genetic diversity in *Taihangia rupestris* Yu et Li, a rare cliff herb endemic to China, based on inter-simple sequence repeat markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 39:553-561.

Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Annual of Eugenics*. 15:313-354.

Young A, Boshier D, Boyle T. (2000) Forest conservation genetics. *Melbourne. Csiro*.

Young AG, Boyle TJ. (2000). Forest fragmentation. In: Young A, Boshier D, Boyle T. Forest conservation genetics. *Melbourne*. 123-135.

Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Kaltchuk-Santos E, et al. (2012). Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genet. Mol. Biol.* 35: 1020-1026.