



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Diversidade genética de quatro populações de
jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* - Fabaceae) por
meio de marcadores microssatélites

MARIANA ARAÚJO BARRETO

Ilhéus - Bahia
Julho de 2010

MARIANA ARAÚJO BARRETO

Diversidade genética de quatro populações de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* - Fabaceae) por meio de marcadores microssatélites

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Ilhéus - Bahia

Julho de 2010

B273

Barreto, Mariana Araújo.

Diversidade genética de quatro populações de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* – Fabaceae) por meio de marcadores microssatélites / Mariana Araújo Barreto. – Ilhéus, BA: UESC, 2010.
xii, 116f. : il.; anexos.

Orientador: Ronan Xavier Corrêa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui bibliografia.

1. Genética vegetal. 2. Jacarandá – Mata Atlântica. 3. Diversidade das plantas - Conservação. 4. Paisagens fragmentadas. 5. Microssatélites (Genética). I. Título.

CDD 581.35

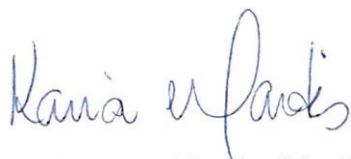
MARIANA ARAÚJO BARRETO

Diversidade genética de quatro populações de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* - Fabaceae) por meio de marcadores microssatélites

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Aprovada em 27 de Julho de 2010



Profa. Dra. Karina Martins
(UFSCar)



Prof. Dr. Roberto Tarazi
(UESC)



Profa. Dra. Simone Gualberto Santos
(UESC)



Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
(UESC - orientador)

—
Mas, a todos quantos o receberam, aos que crêem no seu nome,
deu-lhes o poder de se tornarem filhos de Deus.

João, 1:12

Ao meu filho, Michel, pela alegria que trouxe à minha vida,

Aos meus pais em retribuição ao apoio incondicional.

Ao meu avô e às minhas avós e minha madrinha Sônia,

in memória, pelo amor e pelo incentivo aos meus estudos,

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me ajudado a concluir mais uma etapa do meu sonho e por estar presente em todos os momentos de minha vida.

A todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, me acompanharam durante esta etapa de minha vida e torceram pelo meu sucesso, em especial:

À minha equipe de orientação:

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa, por ter assumido minha orientação e ter depositado inteira confiança na minha pessoa. Obrigada pela oportunidade! Obrigada pelo suporte científico, possibilitando a realização deste trabalho. Obrigada pela atenção pela paciência ao lidar com os problemas, pela amizade e pelo exemplo de profissionalismo! Obrigada pela oportunidade de aprendizado (incluindo as correções gramaticais). Obrigada pela orientação!

Prof. Dra. Fernanda Amado Gaiotto, pelo fundamental auxílio na realização deste trabalho. Obrigada pela orientação e pelo suporte científico, pelos ensinamentos repassados com paciência! Obrigada pela ajuda inestimável na análise de genética de populações! Obrigada pela amizade!

Prof. Dra. Janisete Silva-Miller, Obrigada pela análise criteriosa deste trabalho!

Gostaria de agradecer também:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela concessão da bolsa de Mestrado e pelo apoio financeiro.

A toda equipe de pesquisadores do Laboratório de Genética Molecular Aplicada, do Centro de Biotecnologia e Genética, LBGM-CBG, da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, onde desenvolvi este trabalho e aos quais recorri muitas vezes para tirar dúvidas, e que sempre deram demonstrações de boa vontade, obrigada pela amizade, pelo convívio e pela ajuda.

Ao Técnico José Lima da Paixão, pela ajuda nas coletas em campo que, apesar de exaustivas, foram muito divertidas. Obrigada pelo apoio essencial!

A Marília Bispo de Santana (estudante de Iniciação Científica), pela ajuda com as atividades técnicas e pela amizade!

Ao Mestre Ivandílson Pessoa Pinto de Menezes, pelo auxílio prestado com as análises estatísticas.

Às minhas amigas Elaini e Gislaine, por me mostrar o quanto eu sou capaz, apoiando-me e dando forças nas horas difíceis, e sorrindo junto comigo ao ver pronto este trabalho.

A Michel por entender minhas faltas e continuar amando-me. Obrigada pelo suporte emocional ao final do desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais colegas, professores e funcionários do curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelos ensinamentos, pelo convívio e pela amizade, principalmente, Jeiza Leal, Jamille do Valle, Luciana Cidade, Luciana Calazans e Fabrícia Silva.

ÍNDICE

EXTRATO	IX
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Biologia do jacarandá-da-bahia	4
2.2. Biodiversidade e Mata Atlântica	9
2.2.1. O problema das populações pequenas.....	12
2.2.2. Como podemos mensurar a estrutura genética?	18
2.3. Marcadores Genéticos Moleculares.....	22
2.3.1. Marcadores microssatélites.....	25
3. METODOLOGIA	29
3.1. Área de estudo e amostragem.....	29
3.2. Extração de DNA total e amplificação via PCR-SSR	31
3.4. Análise estatística de dados	32
5. RESULTADOS	35

6. DISCUSSÃO	79
5. CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXO I.....	113

EXTRATO

BARRETO, Mariana Araújo, M.Sc., Universidade Estadual de Santa Cruz, Julho de 2010. Diversidade Genética de quatro populações de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* – Fabaceae) por meio de marcadores microssatélites. Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto e Colaboradora Janisete Gomes da Silva-Miller.

Dalbergia nigra (Vell.) Allemão ex Benth. (Jacarandá-da-Bahia) é uma árvore de vida longa, endêmicas do bioma Mata Atlântica. Devido ao seu elevado valor comercial, esta espécie tem sido amplamente explorada para a produção de madeira. Atualmente está em perigo. Analisou-se a diversidade genética de 140 indivíduos de quatro diferentes fragmentos florestais no sul da Bahia, a fim de verificar possíveis efeitos da fragmentação em suas populações e fornecer informações para iniciativas de conservação. Níveis de polimorfismo foram detectados a partir da genotipagem com nove locos microssatélites. Detectou-se uma redução da diversidade genética ($HE=0,785$; $HO=0,572$), desvios moderados de panmixia ($f=0,287$) e divergência genética elevada ($\theta_P = 0,191$), de acordo

com o fluxo gênico histórico baixo. A análise Bayesiana revelou quatro grupos homogêneos, indicando que os indivíduos se relacionam com suas populações de origem. De acordo com os resultados existe diferenciação e elevados níveis de endogamia nas populações de jacarandá-da-Bahia amostradas e, portanto políticas de conservação são necessárias para a espécie.

Palavras-chave: Genética da conservação, Fabaceae, marcadores microssatélites, jacarandá-da-Bahia, análise Bayesiana, fragmentação florestal.

ABSTRACT

BARRETO, Mariana Araújo, M.Sc., Universidade Estadual de Santa Cruz, Julho de 2010. Genetic diversity of four rosewood populations (*Dalbergia nigra* – Fabaceae) assessed with SSR markers. Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto e Colaboradora Janisete Gomes da Silva-Miller.

Dalbergia nigra (Vell.) Allemão ex Benth. (Brazilian rosewood) is a long-living endemic tree in the Atlantic Forest biome. Due to its high commercial value, this species has been widely exploited for timber production. Nowadays it is endangered. We analyze the genetic diversity of 140 individuals from four different forest fragments in Southern Bahia State, in order to verify possible effects of fragmentation in these populations, and provide information for conservation initiatives. High polymorphism levels were detected from the genotyping with nine microsatellite loci. We detected genetic diversity reduction ($HE = 0.785$; $HO = 0.572$), moderated deviations from panmixia ($f = 0.287$) and high genetic divergence ($\theta P = 0.191$), consistent with historically low gene flow. The Bayesian analysis revealed four homogeneous groups indicating that the individuals are xii

related with their populations of origin. According to the results there is high level of differentiation and inbreeding rosewood population's, and thus maintenance policies are necessary for the species.

Keywords: Conservation genetics, Fabaceae, Microsatellite Markers, Brazilian rosewood, Bayesian Analysis, Forest fragmentation.

1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um dos 34 *hotspots* de biodiversidade reconhecidos no mundo (LAGOS; MULLER, 2007). Os *hotspots* são áreas que perderam pelo menos 70% de sua cobertura vegetal original, mas que abrigam mais de 60% de todas as espécies terrestres do planeta (FREIRE *et al.*, 2007; MMA, 2000). Desde o período da colonização no Brasil, a Mata Atlântica passou por uma longa história de uso intensivo da terra para exploração de produtos e isso tem contribuído para a sua degradação. A intensa perda e fragmentação de habitats que ocorreu na Mata Atlântica representam a mais séria ameaça de extinção de espécies (WILSON, 1997; PRIMACK; RODRIGUES, 2001; YOUNG, 1996; FREIRE *et al.*, 2007; RAPOSO *et al.*, 2007). Por consequência da fragmentação da Mata Atlântica, atualmente poucos indivíduos são encontrados na forma de pequenos grupamentos isolados nos fragmentos de floresta.

Dentre as espécies que habitam a Mata Atlântica têm-se o jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allem. Ex Benth). O jacarandá-da-bahia é uma leguminosa que pode atingir cerca de 25m. Esta espécie possui uma das mais valiosas madeiras brasileiras e foi utilizada, desde o período do império brasileiro, na produção de mobílias de luxo, instrumentos musicais e materiais decorativos

(CARVALHO, 1997). Associados a extração seletiva de madeira, a fragmentação e perda de habitats representam uma ameaça às plantas lenhosas em escala local e regional. Atualmente a ocorrência desta espécie está restrita ao Sul do estado da Bahia e ao Leste de Minas Gerais. Essas características contribuíram para inclusão do jacarandá-da-bahia na lista de espécies ameaçadas de extinção.

Nos últimos anos, a proteção da diversidade biológica tem sido um dos principais alvos dos esforços envolvendo conservação e manejo por causa das importantes implicações evolutivas. A relação com que os genes estão distribuídos nos indivíduos é importante não só por fornecer subsídios para um melhor conhecimento acerca do sistema reprodutivo, mas também por resultar na obtenção de informações básicas que são úteis para o estabelecimento de estratégias adequadas para conservação de espécies de interesse ecológico e econômico.

A variabilidade genética de cada espécie é considerada um componente fundamental da diversidade biológica. Essa variação é produto das mutações e trocas genéticas (fluxo gênico) essenciais para seu *fitness* e que garantem sua sobrevivência em um meio ambiente dinâmico (seleção natural). A variabilidade dentro de populações pode ser medida pelo nível de heterozigosidade esperada nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e), número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o) e índice de fixação (F). Segundo Weir (1996) a frequência de heterozigotos é um importante indicador da diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes.

As estimativas de estrutura genética em populações naturais garantem a eficiência de estratégias de conservação genética (RIDLEY, 2006). A estrutura genética refere-se à distribuição não aleatória dos alelos e genótipos no espaço e

no tempo, resultante da ação de forças evolutivas tais como: mutação, migração, seleção e deriva genética (HAMRICK, 1982). As medidas mais eficientes na avaliação da estrutura genética são aquelas baseadas nas estatísticas-F de Wright (1951).

Nesse contexto e considerando a escassez de informações relativas as conseqüências genéticas da exploração do jacarandá-da-bahia e da atual fragmentação da Mata Atlântica, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a diversidade genética de populações de jacarandá-da-bahia em remanescentes de Mata Atlântica do sul da Bahia utilizando marcadores microsatélites;

E, em uma perspectiva específica:

1. Quantificar os níveis de variabilidade genética de jacarandá-da-bahia em quatro populações naturais;
2. Discutir possíveis impactos do processo de fragmentação na variabilidade e estrutura genética;
3. Estimar fluxo gênico histórico a partir dos valores de G_{ST} ;
4. Evidenciar numericamente a necessidade de conservar o jacarandá-da-bahia e sugerir estratégias de conservação e uso sustentável;

O estudo teve como base a hipótese de que o processo de exploração florestal promove redução da variabilidade genética, aumentando os níveis de endogamia e conseqüentemente alterando a estrutura genética de populações naturais de jacarandá-da-bahia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biologia do jacarandá-da-bahia

O jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allem. ex. Benth) (Figura 1a) pertence à família Fabaceae. Esta família representa a terceira maior família das Angiospermas e a segunda maior família do ponto de vista econômico. Uma característica marcante da família é o fruto que forma um legume. Cronquist (1981, 1988), em seu sistema de classificação considerou os legumes como três famílias independentes. Contudo, o monofiletismo de Fabaceae, respaldado por estudos filogenéticos baseados em características morfológicas e dados moleculares, aponta para o tratamento de uma única família dividida em três subfamílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Faboideae) (JUDD *et al.*, 2002; SIMPSON, 2006; JUCHUM *et al.*, 2007)

Papilionoideae é maior das três subfamílias de Fabaceae, apresentando distribuição cosmopolita incluindo 476 gêneros e 14.000 espécies. No Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros (SOUZA; LORENZI, 2005), dos quais *Dalbergia* L.f. é o segundo maior da tribo Dalbergeae Bronn ex. D.C.. Papilionoideae caracteriza-

se pelas folhas geralmente pinadas, flores papilionáceas com simetria zigomorfa e ausência de pleurograma (JUDD *et al.*, 2002; SIMPSON, 2006), o que as diferencia das Caesalpinioideae e Mimosoideae. Análises moleculares de Fabaceae revelam que esta subfamília divergiu das outras subfamílias há cerca de 40 a 50 milhões de anos (DOYLE; LUCKOW, 2003) e de acordo com Marchiori (1997) é a subfamília que apresenta os caracteres mais autapomórficos das Fabaceae.

O gênero *Dalbergia* é representado por 100 espécies de árvores, arbustos e lianas distribuídos pantropicalmente. O gênero surgiu na África, de onde dispersou, tanto para o leste, como para o oeste. As diferentes condições climáticas e ecossistemas da Ásia e América do Sul influenciaram os diferentes modos de evolução do gênero (ALMEIDA, 2001). É possível encontrar espécies de *Dalbergia* nos mais variados tipos de vegetação, como: Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Campo Rupestre (CARVALHO, 1997).

No Brasil observa-se a ocorrência de 40 espécies de *Dalbergia*, das quais 10 ocorrem no estado da Bahia: *D. nigra* (jacarandá-da-bahia), *D. foliolosa* (jacarandá-rosa), *D. miscolobium* (jacarandá do cerrado), *D. decipulares* (sebastião-de-arruda), *D. cearencis* (jacarandá-voioleta), *D. glaucescens*, *D. frutescens*, *D. ecastaphyllum*, *D. catincola* e *D. acuta* (CARVALHO, 1992). As mais importantes diferenças entre as espécies deste gênero residem, primeiro, nos habitats muito diversos, depois, os frutos fornecem excelentes características distintivas, e finalmente as cascas associadas às madeiras (RIZZINI, 1986). Muitas das espécies de *Dalbergia* são economicamente importantes devido a sua bonita e valiosa madeira (CARVALHO, 1997).

O jacarandá-da-bahia é uma espécie endêmica da Mata Atlântica. Esta espécie caracteriza-se como perinifólia a semicaducifólia, de caráter pioneiro, sendo encontrada nas encostas bem drenadas, tanto no interior da mata primária densa, como em formações secundárias (LORENZI, 1992; RÊGO; POSSAMAI, 2003). Floresce e frutifica no intervalo de 2-3 anos e o seu fruto amadurece antes da nova folhada (LEÃO; VINHA, 1975; CARVALHO, 1989). As flores são pequenas (0,9-1cm) polinizadas principalmente por abelhas (BORTOLUZZI et al., 2003; MATHILDE, 2008). Quanto ao sistema de reprodução, Oliveira e Sigrist (2008) mencionam auto-incompatibilidade de ação tardia. Os frutos são uma sâmara glaba casatanho-escuro com duas sementes (BORTOLUZZI et al., 2003) (Figura 1c), característica que distingue o jacarandá-da-bahia das demais espécies do gênero. A dispersão das sementes apresenta adaptação anemocórica. As sementes são produzidas em grandes quantidades, mas a produção é dificultada por papagaios que se alimentam dos frutos imaturos (DONADIO; DEMATTÊ, 2000). É uma árvore muito ornamental, largamente empregada em paisagismo por sua folhagem delicada e forma aberta da copa. Como planta rústica e adaptada a terrenos secos é ótima para plantios mistos em terrenos degradados de preservação permanente (RÊGO; POSSAMAI, 2003), mas dificilmente se encontra em regeneração natural, pois o coelho-do-mato é ávido por suas plântulas. Este animal é o maior inimigo natural do jacarandá na fase inicial de sua vida (DONADIO; DEMATTÊ, 2000). Em vista destas características, as plantas remanescentes na floresta nativa são comumente encontradas na forma de grupamentos de baixa densidade em locais de difícil acesso (COSTA *et al.*, 2005) e isso tem contribuído para a raridade da espécie. Esta espécie tem alto potencial para o manejo florestal sustentável. Entre as principais características

estão à facilidade de comercialização no mercado atual, devido à madeira de alta qualidade, alta taxa de regeneração em florestas alteradas, e fácil adaptação em terrenos de baixa fertilidade (RÊGO; POSSAMAI, 2003).

O jacarandá-da-bahia possui uma das mais valiosas madeiras brasileiras (GALVÃO *et al.*, 1979). A espécie pode atingir de 15-25m de altura e 15-45cm de diâmetro (RÊGO; POSSAMAI, 2003) (Figura1d;e). A madeira é resistente com uma textura um pouco oleosa e uma fragrância agradável, de cor negra e que apesar de seu peso e densidade, 0,87 g/cm³, é facilmente trabalhada e resiste ao apodrecimento mesmo nas quentes e úmidas condições tropicais (CARVALHO, 1992; CORREIA, 1978; ALMEIDA, 2001). Por essas características, a madeira desta espécie foi empregada na produção de mobílias de luxo, instrumentos musicais e materiais decorativos. A madeira do jacarandá-da-bahia é a mais valiosa das madeiras nacionais tendo sua popularidade iniciada no período do Império. A madeira é bem conhecida no negócio da música como um material ideal na fabricação de violões e o seu emprego na fabricação de pianos é mundialmente conhecido (CARVALHO, 1997). A popularidade da madeira do jacarandá-da-bahia iniciou-se no período do império brasileiro, e foi por consequência do intenso processo de exploração extrativista, associado com o desmatamento da Mata Atlântica que esta espécie foi inserida na Lista Vermelha de ameaça de extinção da IUCN na categoria vulnerável (VARTY, 2006). Além disso, é considerada espécie ameaçada na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 2008).

O jacarandá-da-bahia apresenta distribuição natural nos estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro, embora, atualmente esteja reduzida a pequenas árvores em florestas secundárias (CARVALHO, 1997;

JUCHUM *et al.*, 2007). Em virtude das características inerentes do jacarandá-da-bahia, poucos são estudos realizados com esta espécie. Almeida (2001) utilizou marcadores RAPD para avaliar a diversidade genética de acessos de jacarandá-da-bahia localizados no banco de germoplasma da Estação Ecológica do Pau-brasil, em Porto Seguro-BA (ESPAB). Os resultados revelaram que a diversidade desses acessos é ampla e está distribuída entre os acessos. Acredita-se que as sementes que originaram o arboreto foram coletadas de plantas adultas, a cerca de 30 anos, em uma época em que a Mata Atlântica se encontrava pouco degradada, o que torna o banco genético da ESPAB uma preciosa ferramenta para programas de recuperação e conservação do jacarandá-da-bahia. Além disso, outras árvores nativas de mata da ESPAB foram genotipadas com marcadores RAPD por Juchum *et al.* (2007) e revelaram diversidade genética relativamente menor quando comparada com a diversidade genética encontrada para os acessos do germoplasma, o que foi explicado com base na constituição do banco que incluía materiais de diversas localidades da Mata Atlântica. A variação e estruturação genética de remanescentes de jacarandá-da-bahia foram analisadas, com base em marcadores isoenzimáticos, em estudos realizado no Parque Estadual do Rio Doce (MG) evidenciando diferenciação genética em populações sob ação antrópica (RIBEIRO *et al.*, 2005).



Figura1. *Dalbergia nigra*. a) Planta jovem crescendo a pleno sol no município de Uruçuca (Foto: M.A. Barreto); b) Folha de planta pleno sol (Foto: M.A. Barreto); c) Frutos (Foto: M.A. Barreto); d) Caule de planta jovem com CAP 30 cm (Foto: R.X. Corrêa); e) Caule de planta adulta com CAP 90 cm (Foto: F.A. Gaiotto).

2.2. Biodiversidade e Mata Atlântica

O termo biodiversidade (diversidade biológica) foi adotado no final da década de 80 e desde a sua origem trazia a idéia de conjunto de variabilidade ecológica e genética dos seres vivos (WILSON, 1997; SOLÉ-CAVA, 2001). Esta variabilidade manifesta-se em todos os níveis de organização – das moléculas até os ecossistemas – e diz respeito a todas as espécies. Os indivíduos de uma espécie diferem uns dos outros (TISSOT-SQUALLI, 2006), e isso é resultado da

dinâmica de ecossistemas e espécies, em muitas escalas diferentes mediante processos ecológicos e evolutivos que mantêm a variabilidade genética e populacional (GALINHO-LEAL *et al.*, 2005).

A variabilidade genética de cada espécie é considerada um componente fundamental da diversidade biológica. As espécies são compostas de populações geneticamente distintas. Essa variação é produto das mutações e trocas genéticas (fluxo gênico) essenciais para seu valor adaptativo (*fitness*), que garantem sua sobrevivência em um meio ambiente dinâmico (seleção natural) (RICKLEFS, 2006; CAVALLI; WINGE, 2003). Dessa forma, é fundamental compreender a estrutura genética das populações ao longo da distribuição das espécies.

Embora não conhecido, um grande número de espécies foi extinto, enquanto que muitas outras têm tamanhos populacionais reduzidos, o que as colocam em risco. A escala do problema é enorme e tem sido chamada de “sexta-extinção” (FRANKHAM *et al.*, 2008). Em poucas décadas, o impacto humano saltou de uma escala local relacionada com poluição e superexploração de populações de plantas e animais, para uma escala global, principalmente com as mudanças climáticas. Inúmeras evidências sugerem que o planeta tem vivido um dos maiores episódios de extinção de sua história (GALINHO-LEAL *et al.*, 2005), dentre elas, destaca-se a degradação dos biomas que ameaça de extinção espécies da fauna e da flora.

As florestas tropicais estão incluídas entre os ecossistemas mais ricos em espécies do planeta que, pela alta taxa de desmatamento e degradação de seus ambientes, têm sofrido a perda de inúmeras espécies da fauna e da flora em decorrência da redução da área de ocorrência e isolamento de habitats naturais

(YOUNG *et al.*, 1996; WILSON, 1997). O Brasil apesar de possuir a maior riqueza biológica do mundo teve sua cobertura vegetal original reduzida a pequenas extensões. Em estado crítico encontra-se a Mata Atlântica, considerada um *hotspots* de biodiversidade.

Desde o período de colonização do Brasil, a Mata Atlântica tem passado por uma história de uso intensivo da terra para exploração de produtos, incluindo os ciclos de exploração de pau-brasil, cana-de-açúcar, café, cacau e pecuária (GALINHO-LEAL; CÂMARA, 2005; TABARELLI *et al.*, 2006). Durante a década de 1970 houve um grande estímulo do governo federal, por meio do Programa Pró-Álcool, para ampliação da produção de álcool em função da crise mundial do petróleo (TABARELLI *et al.*, 2006). Causas mais recente incluem formas intensivas de cultura de soja, subsidiadas pelo governo e a expansão dos reflorestamentos com *Pinus* e *Eucalyptus* (GALINHO-LEAL; CÂMARA, 2005). Atualmente, restam 7% da área original de Mata Atlântica no país, na forma de fragmentos florestais (GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas foram estabelecidos corredores de biodiversidade na Mata Atlântica com o intuito de estabelecer áreas de prioridade. O Corredor Central se estende pelos estados da Bahia e Espírito Santo e é único pela presença de diversos táxons. Alguns dos blocos mais importantes de floresta, incluindo Parques Nacionais, estão localizados no extremo Sul da Bahia, cerca de 500km² de mata. Uma riqueza elevada de espécies de plantas tem sido documentada perto de Una-BA, 454 espécies de árvores por hectare. Este corredor também abriga 60% dos primatas endêmicos da Mata Atlântica, além do elevado endemismo de aves e anfíbios. O Corredor Central tem cerca de 40 áreas protegidas, das quais 70% são administradas pela União. No entanto, o

crescente desmatamento da Mata Atlântica na Bahia faz da criação de novas áreas protegidas e do fortalecimento de políticas conservacionistas uma prioridade máxima dessa região (LAGOS; MULLER, 2007).

A região do Sul da Bahia, que está inserida no Corredor Central da Mata Atlântica, teve no cultivo de cacau um aliado importante na conservação da Mata Atlântica. Isso porque o cacau é cultivado no sistema de cabruca. A cabruca consiste em um sistema agroflorestal que mantém remanescentes de Mata Atlântica para sombrear o cacauzeiro. Este tipo de plantação permite a manutenção de maior conectividade entre os fragmentos florestais inserido na cabruca. Entretanto, nos anos 90, os baixos preços no mercado e uma doença devastadora, conhecida como vassoura-de-bruxa, causaram o desmatamento de grandes áreas de cabruca para dar lugar a pastagens e monoculturas, o que também contribuiu para redução da cobertura vegetal nesta região.

Numerosos fragmentos de Mata Atlântica estão espalhados por uma matriz que certamente é prejudicial à sobrevivência das espécies ao longo do tempo. Associados a esse desmatamento, a extração seletiva de madeira, os incêndios florestais e a caça, causam a redução das populações da fauna e da flora. A redução do tamanho populacional implica na ruptura de processos ecológicos e evolutivos únicos.

2.2.1. O problema das populações pequenas

Espécies alvo para conservação têm, por definição, tamanho populacional pequeno ou em declínio, a exemplo do jacarandá-da-bahia. Populações pequenas e isoladas sofrem endogamia acelerada e perda da diversidade genética, o que

leva a depressão endogâmica e menor habilidade de evoluírem em resposta as mudanças ambientais (FRANKHAM *et al.*, 2008). Espécies ameaçadas geralmente têm menores níveis de diversidade genética do que espécies relacionadas não ameaçadas. No geral, espécies ameaçadas têm 60% da diversidade genética das espécies não ameaçadas, e a explicação mais provável é que a diversidade genética é perdida quando o tamanho populacional é reduzido (FRANKHAM *et al.*, 2008; PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A formação de fragmentos florestais isola as populações e conseqüentemente as tornam mais suscetíveis a problemas estocásticos da fragmentação (YOUNG *et al.*, 1996). Populações fragmentadas sofrerão os efeitos de deriva genética, gargalo genético, e endogamia em todos os seus locos (ELLSTRAND *et al.*, 1993). A intensidade destes efeitos vai depender do tamanho do fragmento formado e do grau de isolamento.

Em fragmentos populacionais grandes o resultado do isolamento será uma redução na freqüência de heterozigotos (efeito de Wahlund). Entretanto, em fragmentos pequenos esse efeito é acentuado, uma vez que, pode ocorrer a eliminação ou fixação de alguns genes ao longo das gerações devido às oscilações nas freqüências gênicas. Dessa forma, o tamanho efetivo populacional (N_e) é um parâmetro relevante para utilização dos geneticistas da conservação. O tamanho efetivo é a representatividade genética das populações sendo dependente dos níveis de endogamia e deriva genética, de modo que, quanto maiores estes níveis, menor será a representatividade genética da amostra (HEDRICK, 2001).

As reduções populacionais têm efeito sobre as populações futuras. Uma drástica redução do tamanho efetivo por um longo período, por exemplo, tem

como consequência a perda da diversidade genética e a redução do potencial evolutivo, isso é o que chamamos de efeito de gargalo genético (YOUNG *et al.*, 1996). Isso porque após a ocorrência de um gargalo genético é muito difícil recuperar o tamanho efetivo original da amostra. No entanto, se uma população com tamanho efetivo reduzido recoloniza uma área, todos os genes terão origem da população de fundadores e esta população apresentará baixa variabilidade genética, isso é o que chamamos de efeito fundador. Desse modo, a manutenção de um tamanho efetivo adequado diminui a probabilidade dessas oscilações genéticas e aumenta a probabilidade das frequências alélicas permanecerem próximas as das populações de origem (ELLSTRAND *et al.*, 1993). De acordo com Frankel e Soule (1981), a conservação a curto e médio prazo requer um N_e igual a 50 para prevenir a perda de alelos raros e um N_e igual a 500 para a conservação de alelos raros em longo prazo. Entretanto, não há um número consensual, o tamanho efetivo varia em função de características de cada população, grau de interferência humana, sistema biológico de cada espécie, etc.

A manutenção de um tamanho efetivo ideal tem efeitos positivos na manutenção da endogamia. A endogamia é a probabilidade de um indivíduo herdar um alelo idêntico por descendência e tem como consequência a perda de heterozigotos. Em plantas a endogamia ocorre de duas maneiras: por autofecundação ou por cruzamento entre parentes. A autofecundação, o caso mais extremo de endogamia, pode ser evitada por autoincompatibilidade ou por dioiccia, enquanto o cruzamento entre parentes é favorecido quando as populações são pequenas ou subdivididas (ELLSTRAND *et al.*, 1993), principalmente quando a dispersão de pólen ou sementes é restrita. A endogamia é mensurada pelo coeficiente de endogamia (F). (FUTUYMA, 1992; FRANKHAM

et al., 2008; MORAES *et al.*, 2005). A maior consequência da endogamia sobre as pequenas populações é que o aumento dos homozigotos para alelos recessivos deletérios (depressão endogâmica) é mais freqüente do que em populações que se reproduzem ao acaso (FRANKHAM *et al.*, 2008). Conseqüentemente ocorre redução da diversidade genética e aumento do risco de extinção. Por essa razão, o estudo da endogamia é de extrema importância na biologia da conservação.

A manutenção de um tamanho efetivo ideal tem efeitos positivos, também, na redução da flutuação das freqüências alélicas. Populações com tamanho efetivo reduzido tendem a perder mais freqüentemente, alguns alelos, especialmente os mais raros, por deriva genética. A deriva genética é a mudança aleatória nas freqüências alélicas. Seus efeitos são geralmente pequenos em populações grandes, mas em populações pequenas os efeitos da deriva genética causam flutuações das freqüências alélicas de uma geração para outra (ELLSTRAND *et al.*, 1993). Essas flutuações têm consequências sobre a evolução dessas populações: perda de diversidade genética e fixação de alelos dentro das populações com consequente redução no potencial evolutivo; e, diferenciação entre os fragmentos de populações da mesma fonte original (FRANKHAM *et al.*, 2008).

A endogamia e a deriva genética são as principais causas da perda de variabilidade genética em populações pequenas, juntos esses fatores aumentam o risco de extinção dessas populações (ELLSTRAND *et al.*, 1993). No entanto, a ocorrência de fluxo gênico pode restaurar a diversidade genética reduzindo a diferença entre as populações (FRANKHAM *et al.*, 2004). O fluxo gênico inclui todos os mecanismos que resultam das movimentações de genes de uma

população para a outra, como consequência, tende a homogeneizar geneticamente as populações (NEIGEL, 1997).

A probabilidade de ocorrência e manutenção do fluxo gênico depende da capacidade de dispersão e do modo de reprodução das espécies. Na maioria das espécies de planta o fluxo gênico ocorre pela movimentação de pólen ou dispersão das sementes (BORÉM, 2005, MARTINS, 1987). Espécies polinizadas e dispersas pelo vento apresentarão como fator limitante para ocorrência de fluxo gênico a distância entre os fragmentos, enquanto que espécies polinizadas e dispersas pela fauna sujeitam-se as respostas dessa fauna associada à fragmentação (MARTINS, 2005; YOUNG *et al.*, 1996). De modo geral, será considerada migração quando um grão de pólen imigrante se estabelecer como embrião ou quando a semente imigrante se estabelecer em uma população (SLATKIN, 1995). Estudos têm mostrado algumas distâncias consideráveis de fluxo gênico em espécies arbóreas (atingindo quilômetros de distância) (PETIT; HAMPE, 2006; BURCZYK, 2004) e que espécies mais raras apresentam distâncias de fluxo gênico maiores do que as de espécies mais comuns (KAGEYAMA *et al.*, 1998).

De acordo com Futuyma (1992) o grau no qual uma população pode ser delimitada depende do nível de fluxo gênico, o qual influencia o tamanho efetivo da população. Entre os modelos de fluxo gênico, que correspondem a diferenças na estrutura da população, estão:

1. O modelo de “continente-ilha”: efetivamente existe um movimento unidirecional de uma população grande, “continental”, para uma menor e isolada, “ilha”;
2. O modelo “stepping-stone” (ou “alpondras”): cada população recebe migrante somente das populações vizinhas;

3. O modelo de “isolamento por distância”: o fluxo gênico ocorre localmente entre os indivíduos vizinhos em uma população de distribuição contínua. Esse processo ocorre quando há restrições ao fluxo gênico que podem levar as populações a diferenciar-se geneticamente, ocasionando uma estruturação espacial da diversidade genética e apresenta um padrão de mudanças genéticas semelhantes à endogamia, na medida em que leva a um excesso de homozigotos;
4. O modelo de “ilhas”: a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações. O modelo de ilhas proposto por Wright é o modelo convencional de genética de populações de troca de genes entre populações. Neste modelo o número efetivo de migrantes (N_m) é estimado através das estatísticas-F para um conjunto n de populações. O modelo assume equilíbrio entre migração e deriva genética entre todas as populações, e assume que todas as populações são iguais fontes de migrantes e produz estimativas que não refletem a variação contemporânea na troca de genes entre populações ou mudanças atuais no processo dispersivo.

Os dois métodos utilizados para avaliar o fluxo gênico são o histórico e o contemporâneo. As medidas diretas referem-se ao fluxo gênico contemporâneo, enquanto que as indiretas são baseadas na estrutura de populações e referem-se ao fluxo gênico histórico ou passado. O fluxo gênico contemporâneo pode ser estimado por teste de paternidade ou por método baseado em máxima verossimilhança. O fluxo gênico histórico é inferido pelo parâmetro F_{ST} a partir da distribuição da variação genética entre as populações (GAIOTTO *et al.*, 2003; SORK; SMOUSE, 2006).

A interrupção do fluxo gênico entre as populações desempenha um papel importante no processo da especiação. Wright (1931), entretanto, obteve o

surpreendente resultado de que um único migrante por geração é suficiente para evitar os efeitos da deriva e da endogamia sobre as populações pequenas.

2.2.2. Como podemos mensurar a estrutura genética?

A descrição da diversidade genética e do nível de estruturação da variabilidade genética entre diferentes populações é um dos diversos aspectos geralmente observados na caracterização genética das populações naturais (HAMRICK, 1992). A maneira como os genes estão distribuídos nos indivíduos é importante não só por fornecer subsídios para um melhor conhecimento acerca do sistema reprodutivo, mas também por propiciar informações básicas para o estabelecimento de estratégias adequadas para conservação, manejo e melhoramento genético de espécies de interesse ecológico e econômico.

A diversidade genética intrapopulacional tem sido descrita em termos de número médio de alelos por loco (\hat{A}), percentagem de locos polimórficos (P), diversidade genética esperada segundo o princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia, também conhecido como índice de fixação de alelos (f) (BERG; HAMRICK, 1997).

A estimativa da frequência de um alelo particular em uma população é considerada fundamental nos estudos evolutivos, pois a mudança genética de uma população pode ser avaliada pelas mudanças nas suas frequências gênicas (NEI, 1978). O número de alelos observados por loco aumenta em função do tamanho da amostragem. Conseqüentemente grandes amostras possuem maior chance de que alelos raros sejam detectados.

A frequência de heterozigotos é uma medida de diversidade genética, uma vez que o heterozigoto carrega alelos diferentes, portanto, representa melhor a variação genética existente. Entretanto, a diversidade gênica de Nei, ou heterozigosidade esperada, vem a ser uma medida mais apropriada por representar a variação genética tanto em populações de espécies de cruzamento, quanto em espécies de autofecundação (WEIR, 1996). Além disso, o índice de fixação tem sido utilizado como uma medida de desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de cada população. O índice de fixação mede a redução fracionária na heterozigosidade, em relação a uma população de acasalamento aleatório com a mesma frequência alélica (RIDLEY, 2006).

O nível de estruturação da variabilidade genética entre diferentes populações é uma forma particular para descrever a diversidade genética interpopulacional. A estrutura genética refere-se à distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e no tempo. Sua manutenção decorre da interação entre a ação das forças evolutivas (mutação, migração, deriva genética e seleção natural) com os fatores ecológicos (sistema reprodutivo, dispersão de pólen e sementes, distribuição espacial e tamanho efetivo) que atuam dentro do contexto de cada espécie e de população.

O nível de estrutura genética entre as populações tem sido obtido a partir de três metodologias básicas: estatísticas-F (WRIGHT, 1965), análise de variância das frequências gênicas (COCKERHAM, 1969) e análise da diversidade genética em populações subdivididas (NEI, 1973). As três abordagens apresentam base genética similar e são complementares em relação ao significado biológico, especialmente se os marcadores forem neutros (REIS, 1996).

As estatísticas-F fornecem os níveis médios de fixação para o total das populações, dentro das populações e a divergência genética entre as populações, com base em medidas de probabilidade de identidade por descendência (WRIGHT, 1965). A análise de variância fornece a distribuição genética da variabilidade em diversos níveis hierárquicos, considerando o erro associado à amostragem (COCKERHAM, 1969). A diversidade genética de Nei fornece a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações e os níveis de heterozigosidade esperados para o total e para a média das populações (NEI, 1973).

As estatísticas-F foram desenvolvidas por Wright são um modelo matemático conceitual para descrever os desvios totais das proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg como consequência da deriva genética e do sistema reprodutivo. De modo que $1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$, em que, F_{IT} é o índice de fixação para o total das populações, F_{IS} é o índice de fixação intrapopulacional e F_{ST} é o índice de fixação inter-populacional.

A análise das freqüências gênicas foi desenvolvida baseada na pressuposição de que as populações são originadas de uma mesma população ancestral, permitindo, desta forma, uma estimativa de grau de parentesco (coancestralidade) e endogamia. Este modelo considera os erros associado à amostragem reduzindo a inferência de estimativas tendenciosas. Neste modelo, todos os desvios de panmixia também são devidos à deriva genética e ao sistema reprodutivo. Assim como nas estatísticas-F, a análise das freqüências gênicas fornece informações sobre os níveis de fixação de alelos intra-populacional (f) e para o conjunto de populações (F), bem como a divergência genética inter-

populacional ou coeficiente de parentesco entre dois indivíduos dentro de populações (Θ_p), parâmetros relacionados como $f = (F - \Theta_p)(1 - \Theta_p)$.

A análise de diversidade genética foi desenvolvida por Nei (1973) com intuito de obter uma medida de estrutura genética que acomodasse locos multialélicos. Esse modelo pode ser aplicado a qualquer população independente do número de alelos por loco, sistema de reprodução e atuação de forças evolutivas. A proporção da variabilidade total explicada por diferenças genéticas entre as subpopulações é dada por $G_{ST} = D_{ST}/H_T$, em que, D_{ST} é o componente de variação atribuído à diferenciação entre as populações e H_T é heterozigosidade total referente ao conjunto das populações. Assim, quando o interesse está voltado para o quanto às populações se divergiram dentro de uma espécie, o emprego das estatísticas-F de Wright e da análise das frequências gênicas de Cockerham são bastante adequadas para estimar a divergência genética das populações. No entanto, quando as populações sofreram algum tipo de perturbação e não apresentam uma história evolutiva comum, a abordagem da diversidade genética de Nei torna-se mais adequada para estimar a divergência genética das populações.

Uma abordagem alternativa para mensurar o nível de estrutura genética entre as populações é por meio da inferência Bayesiana. O método Bayesiano, ou Teorema de Bayes, como também é conhecido, foi originalmente desenvolvido para os dados de genética humana, sendo posteriormente comprovada sua eficácia também para os dados de populações vegetais complexas, devido à grande acurácia e sensibilidade de suas análises (HOLSINGER; WALLACE, 2004; PERSE; CRANDALL, 2004). Para se realizar uma inferência Bayesiana, é necessário, além dos dados amostrais, o estabelecimento de uma informação *a*

priori sobre os parâmetros e o cálculo da distribuição *a posteriori* dos parâmetros. A essência do ponto de vista Bayesiano é que não existe nenhuma distinção lógica entre os parâmetros do modelo e os dados. Ambas são variáveis aleatórias com uma distribuição de probabilidade conjunta que é especificado por um modelo probabilístico. Desse ponto de vista, os “dados” são as variáveis observadas e os “parâmetros” são variáveis não observadas. A distribuição *a posteriori* é um produto da verossimilhança e da probabilidade *a priori* no final de N iterações (BEAUMONTT; RANNALO, 2004). Quanto maior o número de interações, mais próximo de sua condição de equilíbrio o conjunto de valores gerados se aproxima, de modo que, a convergência é atingida em uma iteração cuja distribuição esteja arbitrariamente próxima da distribuição marginal desejada (REIS, 2008) A distribuição *a posteriori* contém toda a informação probabilística de interesse com relação a um parâmetro. Assim, a inferência sobre o parâmetro é realizada por meio desta distribuição.

Quantificar a diversidade genética requer estudos analíticos e medidas baseadas apenas em estatísticas ecológicas são pouco eficientes. Para evitar questionamentos é necessário associar métodos ecológicos às ferramentas genéticas disponíveis. Ferreira e Grattapaglia (1998) afirmam que para gerar informações sobre a diversidade genética ao nível de DNA a técnica estabelecida e amplamente usada hoje são os marcadores moleculares.

2.3. Marcadores Genéticos Moleculares

Marcadores genéticos são características qualitativas com herança mendeliana simples, facilmente reconhecível, cuja expressão não é influenciada

pelo ambiente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), que permitem analisar as diferenças existentes entre os indivíduos. Sendo genéticos, possuem a propriedade de se comportarem como dominantes (RAPD e AFLP) ou co-dominantes (RFLP e SSR) e podem ser agrupados em marcadores morfológicos, bioquímicos e de DNA.

Os marcadores morfológicos foram usados até meados da década de 1960. São características fenotípicas de fácil visualização, no entanto, freqüentemente controladas por genes dominantes, de modo que, as variações fenotípicas eram raras e as populações eram classificadas como homogêneas (FUTUYAMA, 1992). Além disso, sua aplicação era limitada pelo baixo número de marcadores obtidos.

Na década de 1960 iniciou-se uma revolução no quadro de marcadores com a introdução dos marcadores genéticos. Os estudos puderam incluir comparações diretas ou indiretas sobre informações genotípicas de ácidos nucléicos. Inicialmente foram obtidos marcadores bioquímicos baseados em eletroforese de isoenzimas, que por definição, são produtos da expressão de genes. Pela primeira vez era possível ter acesso a um grande número de locos em qualquer organismo usando apenas uma amostra do tecido (SOLFERINI; SELIVON, 2001) o que permitiu avaliar a diversidade genética entre populações. A análise de enzimas representou um avanço frente às técnicas citológicas e morfológicas, já que estes novos marcadores não são tão profundamente afetados pela interação com o ambiente e possibilitaram um grande avanço na compreensão dos processos evolutivos (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). Apesar da extensiva utilização da técnica de eletroforese de proteínas, os estudos de estrutura populacional e outras aplicações intra-específicas requeriam níveis

razoáveis de variabilidade e os resultados das análises de isoenzimas não se mostravam suficientemente variáveis.

Muitos dos problemas encontrados em estudos de variabilidade genética com marcadores morfológicos e bioquímicos puderam ser superados pela utilização de marcadores de DNA. Estes são mais informativos comparados com os citados anteriormente, pois possibilitam análise direta do DNA sem qualquer influência do meio ambiente (NEI; KUMAR, 2000).

Em 1968, Linn e Arber (1968) e Meselson e Yuan (1968), apud Arias e Infante-Malachias (2001) revolucionaram a nascente Biologia Molecular, com a descoberta das enzimas de restrição ou endonucleases de restrição, utilizadas por Gradzicker (1974) para analisar polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA, uma técnica que ficou conhecida como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Tendo a vantagem de ser amplamente aplicada a genomas de diversos organismos, esses marcadores foram muito utilizados em genética aplicada ao melhoramento e ao estudo de genética de populações. Contudo, as análises com RFLPs têm um custo relativamente elevado e isto tem limitado sua aplicação (ALMEIDA, 2001).

Na década de 1980 surgiram os marcadores minissatélites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), que são regiões dispersas no genoma constituídas de um número variável de seqüências idênticas repetidas lado a lado (em tandem). Estas seqüências repetitivas possuem de 15 a 100 pares de bases (pb) e, em cada loco hipervariável, são repetidas até 50 vezes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O desenvolvimento da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), permitiu a

síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA. A partir dessa técnica surgiram novos marcadores moleculares e conseqüentemente aumentou muito a eficiência de detecção de polimorfismo em nível de DNA ou RNA (LOPES *et al.*, 2002). Dessa forma surgiram as técnicas AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - VOS *et al.*, 1995), microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats* - LITT e LUTY, 1989) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - WILLIAMS *et al.*, 1990). Nesse contexto, a escolha do marcador depende fundamentalmente da pergunta científica, dos métodos de elaboração da parte técnica, do custo efetivo e da demanda de pessoal tecnicamente habilitado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Atualmente, os marcadores microssatélites proporcionam uma das maneiras mais práticas e poderosas disponíveis para acessar a diversidade genética em espécies ameaçadas. Por essa razão foi utilizado neste estudo.

2.3.1. Marcadores microssatélites

Os genomas eucariotos são densamente povoados por seqüências simples repetidas denominadas microssatélites, SSR (*Simple Sequence Repeats*). Os SSRs são seqüências de um a seis nucleotídeos que se repetem inúmeras vezes lado a lado no genoma (em *tandem*) (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O polimorfismo revelado na técnica de microssatélites é devido à diferença de repetições no número de vezes em que, por exemplo, um dinucleotídeo (AG)_n se repete em um loco. Essas variações constituem-se em variações no comprimento do segmento, detectado pela reação de PCR e pela separação dos fragmentos amplificados em eletroforese (FERREIRA, 2001). Os produtos da amplificação

são observados em gel de poliacrilamida desnaturante ou em gel de agarose de alta resolução. A visualização das bandas no gel é realizada por meio de coloração com nitrato de prata ou brometo de etídio. Têm sido usados também *iniciadores* fluorescentes em combinação com seqüenciadores semi-automático de DNA (BORÉM; CAIXETA, 2006).

A mudança no número de repetições microssatélites no genoma é devida à elevada taxa de mutação nestas regiões, numa faixa entre 10^{-3} e 10^{-4} por loco por gameta, o que garante sua hipervariabilidade (AVISE, 2001). Esta instabilidade deve-se aos mecanismos de deslizamento da DNA durante a replicação (o maior responsável pelas taxas de mutações nas regiões microssatélites) e ao *crossing over* desigual causado pelo pareamento errôneo das fitas de DNA durante a recombinação ou a fenômenos complexos, como substituições e inserções/deleções nas regiões flangeadoras dos SSRs (BORÉM; CAIXETA, 2006).

As diferentes repetições de microssatélites encontradas são divididas em: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas; e (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas adjacentes. As repetições compostas podem ser perfeitas ou imperfeitas (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Os SSRs são marcadores co-dominantes, baseados em PCR, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos, dependentes de pequenas quantidades de DNA dos indivíduos analisados e capazes de detectar altos níveis de polimorfismo por loco, (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) quando comparados com outras classes de marcadores. Essas características

conferem elevado conteúdo informativo a esses marcadores. Essa natureza informativa, combinada com a especificidade e rapidez da técnica PCR, fazem desses marcadores uma ferramenta eficiente para análise de genética populacional.

A grande limitação do uso em larga escala de marcadores SSRs é a obtenção dos *iniciadores* que serão usados nas reações PCR para amplificar os alelos de cada loco (FERREIRA, 2001). Trata-se de uma técnica de elevado custo e intensiva em mão-de-obra, considerando todas as etapas do seu desenvolvimento (incluindo construção de biblioteca genômica, seleção de clones positivos, desenvolvimento e teste de *iniciadores*) (BUSO *et al.*, 2003). Entretanto, uma vez obtidos os *iniciadores* informativos para uma espécie, os custos e a demanda em mão-de-obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade desta técnica.

As seqüências de DNA que flanqueia os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie. De modo que permite, em alguns casos, a transferência de marcadores SSRs de genoma para genoma dentro de uma espécie e entre espécies geneticamente relacionadas usando *iniciadores* heterólogos (BUSO *et al.*, 2003). Isso proporciona um aumento no número de dados que podem ser obtidos a partir desses marcadores.

Os marcadores SSRs foram inicialmente estudados no genoma humano onde estão presentes em grande número de cópias, disperso por todo o genoma. Entretanto, o primeiro trabalho em que estas seqüências repetidas foram denominadas microssatélites foi publicado em 1989. Em plantas, a presença das repetições microssatélites foi descrita pela primeira vez em espécies arbóreas tropicais (CONDIT; HUBBELL, 1991). É possível encontrar pelo menos um

microsatélite a cada 6-7 kb. Diversos estudos têm demonstrado que a classe de dinucleotídeos repetidos mais abundantes em vegetais é o AT/TA e AG/TC, e de trinucleotídeos é TAT/ATA. No entanto essas comparações são dificultadas pelos diferentes critérios de tamanho mínimo das repetições (BORÉM; CAIXETA, 2006). De modo geral, a frequência das diferentes classes de SSRs diminui à medida que aumenta o tamanho da unidade repetitiva.

Os marcadores SSRs têm sido aplicados em estudos de diferenciação e estrutura genética de plantas (MARTÍNEZ-CASTILLO *et al.*, 2007; GARRIS *et al.*, 2005), na determinação de origem parental por teste de paternidade (GAIOTTO *et al.*, 2003), em estudos de conservação (MELO *et al.*, 2006), dinâmica populacional (MALUF *et al.*, 2005; MÜHLEN *et al.*, 2000) e na construção de mapas de ligação (FALEIRO, 2003). Em espécies arbóreas os SSRs têm sido aplicado com sucesso em estudos de fluxo gênico, diversidade e estrutura genética de populações, tais como: *Euterpe edullis* (GAIOTTO *et al.*, 2003; SEOANE *et al.*, 2005), *Caesalpinia echinata* (MELO *et al.*, 2006) e *Carapa guianensis* (RAPOSO *et al.*, 2007). Nos estudos de conservação genética de populações naturais, o emprego dos SSRs contribuiu para a melhoria das estimativas de parâmetros genéticos, especialmente em populações com baixa densidade populacional ou que não eram detectados por outras classes de marcadores.

Nesse contexto, os SSRs foram escolhidos para analisar a estrutura genética entre populações de jacarandá-da-bahia. Os *iniciadores* microsatélites de jacarandá foram desenvolvidos recentemente por Ribeiro *et al.* (2008), não havendo estudos populacionais desenvolvidos com estes marcadores para populações do Sul da Bahia.

3. METODOLOGIA

3.1. Área de estudo e amostragem

As quatro populações de jacarandá-da-bahia amostradas neste estudo encontram-se distantes entre si aproximadamente 80 km (Figura 2). Essas populações estão em áreas com diferentes estágios de alteração da Mata Atlântica na região Sul da Bahia:

1. Ibicaraí (estrada para a Reserva Particular do Patrimônio Natural Manacá): essa estrada faz parte do entorno da RPPN, área bastante conservada;
2. Barro Preto (estrada para a Reserva Particular do Patrimônio Natural Pedra Lascada): essa estrada faz parte do entorno da RPPN, área razoavelmente conservada;
3. Arataca (Fazenda Jaci): caracteriza um ambiente peculiar da região Sul da Bahia, a cabruca, que contém remanescentes de Mata Atlântica para sombrear o cacauzeiro. Essa região é, também, conhecida localmente como o berço do jacarandá-da-bahia (comunicação pessoal), área antropizada;

4. Uruçuca (estrada para a Fazenda Almada): ambiente que passa por constantes mudanças em consequência da ação antrópica, uma vez que se trata de terras utilizadas na forma de pastagens, área bastante antropizada.

As amostras foram compostas de folhas jovens de 35 indivíduos adultos de cada população amostrada. Os indivíduos amostrados foram cadastrados e avaliados aqueles com diâmetro a altura do peito (DAP) maior que 15 cm e distantes entre si 60 m. As amostras foram colocadas em um papel filtro contendo sílica-gel, acondicionada em embalagem plástica e encaminhada para o Laboratório de Genética Molecular Aplicada no Centro de Biotecnologia e Genética (LGMA-CBG) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), onde foram armazenados para posterior extração de DNA.



Figure 2: Localização das populações de jacarandá-da-bahia analisadas no presente estudo: 1-Uruçuca, 2-Barro Preto, 3-Ibicaraí, 4-Arataka.

3.2. Extração de DNA total e amplificação via PCR-SSR

A extração do DNA foi realizada de acordo com o procedimento de CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1987) adaptado por Novaes *et al.* (2009) que utiliza β -Mercaptoetanol a 2%, Proteinase-K (1 mg/mL) e SDS 20%. A quantificação do DNA foi feita por comparação com DNA padrão (λ DNA) em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. O DNA foi diluído para 5,0ng/ μ L.

Os 10 pares de iniciadores microssatélites para jacarandá-da-bahia usados neste estudo foram desenvolvidos e padronizados por Ribeiro *et al.* (2008). Esses iniciadores foram modificados pela adição “cauda” de oligonucleotídeos (*tail*) isto é, uma seqüência não comum no genoma estudado (MISSIAGGIA; GRATTAPAGLIA, 2006; OETTING, 1995). Neste caso, foi utilizada uma seqüência do plasmídio M13(-16), a qual foi adicionada a um dos iniciadores de cada par de iniciadores microssatélites. Além desses dois iniciadores (*forward tail* e *reverse*), as misturas de reação foram acrescidas de um terceiro iniciador complementar a esta cauda e marcado com fluorocromo. Três tipos de marcações (HEX, NED e 6-FAM) foram adicionados a este iniciador marcado.

A mistura para as reações de PCR foi composta de 30 ng de DNA genômico, 1X tampão (Tris HCl 1mol.L⁻¹ / KCl 50mol.L⁻¹, pH 8,3 e (NH₄)₂SO₄ 50mol.L⁻¹) , 0,25m.mol.L⁻¹ de cada dNTP, 1,5m.mol.L⁻¹ MgCl₂, 5m.mol.L⁻¹ de iniciador, 0,25m.mol.L⁻¹ de Triton-X 1%, 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e água ultrapura autoclavada para um volume final de 13 μ L. As amplificações foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* da *PerkinElmer* nas condições: 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento (Tabela 1) por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e, um passo a 72 °C

por 10 minutos. Para análise prévia dos testes de amplificação utilizou-se eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo.

O produto das amplificações foi diluído na proporção 1:3 e analisado em gel desnaturante de alta resolução (4% poliacrilamida) no seqüenciador automático de DNA ABI 377/ *Applied Biosystems*, CA. Para cada 2 μ L de reação diluída, foram adicionados 2 μ L de tampão de carregamento de formamida e 1 μ L do marcador de tamanho ROX-500 (*Applied Biosystems*). Essa mistura foi desnaturada a 95°C por cinco minutos e a eletroforese foi realizada por duas horas.

A otimização dos ensaios multiplex foi realizada através de eletroforese combinada de acordo com as cores de fluorescência e a amplitude alélica dos locos, de modo a maximizar a quantidade de locos analisados simultaneamente em um único gel.

3.4. Análise estatística de dados

A detecção e a estimativa do tamanho de alelos em pares de base foram realizadas com o uso do programa *GeneScan* (*Applied Biosystems* versão 3.1.2). Em seguida os valores foram importados para o programa *Genotyper* (*Applied Biosystems* versão 2.5.2) para filtragem de picos, interpretação e compilação final dos dados, definindo o genótipo de cada indivíduo.

Os nove locos microssatélites foram avaliados no programa *Micro-checker* versão 2.2.3 (OOSTERHOUT *et al.* 2004) que identifica erros de genotipagem, permitindo verificar a presença de alelos que não são amplificados (alelos nulos), a dominância de alelos curtos e a presença de *stutters* (bandas duplicadas) .

Os parâmetros de diversidade genética intra-populacional foram estimados com uso do programa GDA versão 1.0 (LEWIS; ZAYKIN, 2002): número médio de alelos por loco (\hat{A}); diversidade gênica (H_e); heterozigosidade observada (H_o) e; índice de fixação (f). O conteúdo de informação polimórfica foi calculado no programa MSTOOS (PARK, 2001). A heterozigosidade máxima foi estimada segundo a fórmula: $H_{e\ max} = (\hat{A} - 1)/\hat{A}$. O índice de fixação foi estimado no programa FSTAT versão 2.9.3.2. (GOUDET, 2001), neste programa, também, foi obtido o p-valor corrigido por Bonferroni para este parâmetro.

As estatísticas-F de Wright (F_{IS} , F_{ST} e F_{IT}) mensuradas de acordo com o modelo aleatório de Weir (1996). A estimação dos parâmetros, acima mencionados, foi realizada utilizando o programa FSTAT versão 2.9.3.2. (GOUDET, 2001). A significância das estatísticas de estrutura genética foi testada pelo método reamostragem do tipo *bootstrap*, utilizando 10.000 reamostragens sobre os locos.

O tamanho populacional efetivo N_e foi estimado de acordo com Vencovsky e Crossa (2003) conforme a fórmula $N_e = n/(1 + f)$. A representatividade genética das amostras foi testada a partir da relação N_e/n e da estimativa do número de indivíduos que representam um tamanho efetivo de 500 plantas em uma população panmítica ideal. O número de populações a serem conservadas para manutenção da diversidade genética foi estimado conforme a fórmula $S = 500 / (2 * F_{ST})$ proposta por Vencovsky e Crossa (2003).

O fluxo gênico histórico entre as populações foi quantificado através de medidas indiretas de acordo com o modelo de Crow e Aoki (1984) conforme a fórmula $N_m = [1/4 [(1/F_{ST}) - 1]] / [4 * [n/(n - 1)^2]]$.

A matriz de distância entre os pares de genótipos, usada para construção do dendrograma, foi calculada com base na proporção de alelos comuns (BOWCOCK *et al.*, 1994), usando o programa MSTOOS (PARK, 2001). O dendrograma foi construído por meio do programa MEGA4 (TAMURA *et al.*, 2007).

A inferência bayesiana foi aplicada para definir grupos populacionais homogêneos e verificar a estruturação genética de 140 árvores de jacarandá-da-bahia utilizando o programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000). As análises foram realizadas sem informar previamente a origem dos indivíduos, utilizando um modelo com mistura e com as frequências correlacionadas. Esta análise admitiu um K variando de 1 a 10 com 10 repetições cada. O comprimento da Cadeia de Markov foi de 50.000, seguido de 100.000 iterações. Para corrigir a detecção do número de grupos a partir de dados não homogêneos foi usada a estatística ΔK (EVANO, 2005) que permite a detecção do número real de grupos a partir de dados genotípicos.

5. RESULTADOS

Dentre os dez locos microssatélites desenvolvidos por Ribeiro *et al.* (2008) para o jacarandá-da-bahia, nove amplificaram de forma eficiente para as populações analisadas com temperatura de anelamento (T_a) variando de 55°C a 57°C e tamanho dos fragmentos variando de 174 pb a 288 pb. Um loco não amplificou fragmentos nítidos e não foi utilizado neste estudo (Tabela 1).

O número total de alelos analisados, a diversidade genética (H_E) e a heterozigosidade observada (H_O) para os 140 indivíduos de jacarandá-da-bahia a partir de nove locos SSR estão representados na Tabela 1. A combinação de nove locos SSR gerou um total de 213 alelos, com uma média $\hat{A}=11$ alelos por locus e que variam de seis (Dnig7) a 16 alelos (Dnig1 e Dnig9), indicando que, embora os locos sejam polimórficos, alguns deles têm um elevado número de alelos com baixa frequência. Os nove loci utilizados detectaram 50% da máxima diversidade possível (0,900). A heterozigosidade esperada (H_E) estimados para cada locus foi maior do que a heterozigosidade observada (H_O) em todos os casos. Os locos Dnig3 e Dnig5 apresentaram o menor valor (0,278) e o maior valor (0,674), respectivamente, para heterozigosidade H_O , com um valor médio de

0,499. A diversidade genética variou de 0,624 para o loco Dnig5 e 0,826 para o locus Dnig9, com uma média de 0,734. O loco Dnig7 apresentou menor PIC, ou seja, detém alelos mais frequentes e poucos alelos raros. Em contrapartida, o loco Dnig9 apresentou maior PIC, também foi um dos locos com maior número de alelos. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) permite avaliar qual loco é mais informativo. Os 140 indivíduos avaliados revelaram um total de 108 alelos na amostra, dos quais 40 são exclusivos (Figura 3).

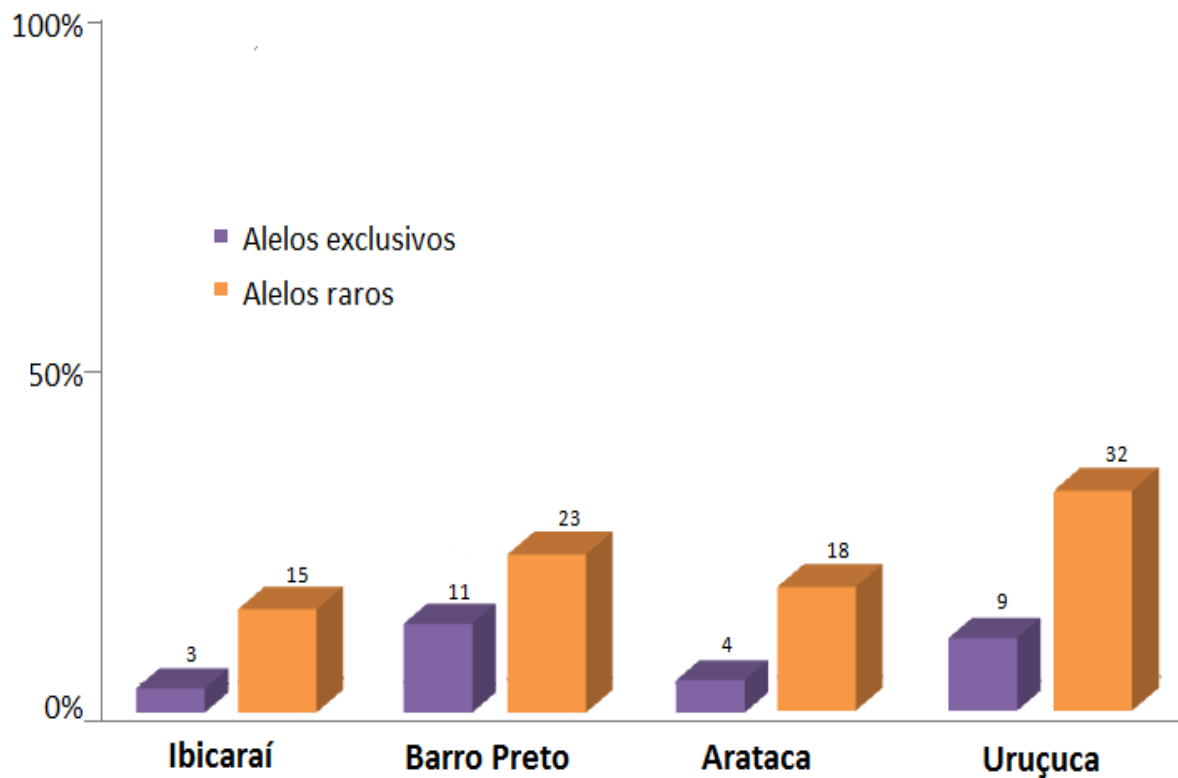


Figura 3: Número de alelos exclusivos para quatro populações de jacarandá-da-bahia da região Sul da Bahia a partir da análise de nove locos microssatélites.

Tabela 1: Estimativas de parâmetros genéticos obtidos a partir da genotipagem de nove locos microssatélites em quatro populações de jacarandá-da-bahia da região Sul da Bahia.

	Dye	PB	Ta (°C)	n _A	n _{pa}	Â	Â _r	H _{MAX}	H _E	H _O	PIC	f
Dnig1	6-FAM - G1	241 - 265	55	26	6	16	12.653	0.938	0.7528	0.5580	0,698	0.280
Dnig2	6-FAM- G2	152 - 244	55	28	4	15	12.232	0.933	0.7893	0.5515	0,739	0.297
Dnig3	6-FAM- G3	174 - 208	55	18	2	10	7.928	0.900	0.6685	0.2786	0,598	0.623
Dnig4	HEX- G2	197 - 241	55	24	4	11	9.179	0.909	0.7740	0.6090	0,720	0.214
Dnig5	HEX- G1	236 - 288	55	29	2	15	10.761	0.933	0.7948	0.6741	0,747	0.151
Dnig6	HEX- G3	263 - 269	55	23	2	11	9.827	0.909	0.7275	0.4060	0,674	0.436
Dnig7	NED- G3	198 - 220	57	14	1	6	4.957	0.833	0.6240	0.5373	0,539	0.129
Dnig9	NED- G1	216 - 270	55	33	5	16	11.944	0.938	0.8263	0.5217	0,788	0.367
Dnig10	NED- G2	251 - 277	54	19	1	8	7.204	0.875	0.7243	0.4656	0,658	0.346
Média					27	11	8.829	0.900	0.734	0.499	0,675	0.324

TM, Temperatura de anelamento; PIC, Conteúdo de informação polimórfica; Â, número de alelos por loco; Â_r, Riqueza alélica; H_{máx}, Heterozigoidade máxima; H_e, heterozigoidade esperada; H_o, heterozigoidade observada; f, índice de fixação de alelos. *=significativo considerando a correção de Bonferroni.

Todos os locos foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg com base no método de Monte-Carlo. Esta análise revelou que muitos dos locos não estavam em equilíbrio para todas as populações estudadas, no entanto apenas 18 locos foram estatisticamente significativos (Tabela 2). Para a maioria das populações estudadas observou-se que quatro dos nove locos desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A exceção foi a população de Uruçuca, onde sete dos nove locos apresentaram um desvio significativo das proporções Hardy-Weinberg.

As estimativas de heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade esperada (H_O) e índice de fixação (f) para cada população de jacarandá-da-bahia bem como o P-valor e o desvio padrão correspondentes são apresentados na Tabela 3. As estimativas do índice de fixação (f) variaram de 0,224, para a população Ibicaí, a 0,415 para a população Uruçuca, com uma média geral de $f = 0,312$. As estimativas do índice de fixação foram significativamente diferentes de zero com P-valor menor que 0,0014. As diferenças encontradas nas estimativas de H_E e H_O corroboram com o excesso de homozigotos nas populações. Parâmetros estimados para a diversidade genética foram semelhantes tanto para as populações mais conservadas localizadas próximo de RPPNs (Barro Preto e Ibicaí) quanto para as populações submetidas a perturbações antrópicas (Uruçuca e Arataca). O padrão de divergência genética entre populações de jacarandá-da-bahia investigadas obtida a partir da distância genética de Nei é mostrado como um dendrograma na figura 4. A análise dos dados mostrou um padrão divergente entre as quatro populações, revelando que as populações de Ibicaí e Arataca são geneticamente similares. O tamanho efetivo populacional (N_E) foi semelhante nas quatro populações analisadas,

enquanto a representatividade genética foi superior a 70%. No que diz respeito ao comportamento dos valores de N_E/n , a menor representatividade genética foi encontrada na população menos preservada. A estimativa do tamanho efetivo $N_e=500$, necessário para a manutenção da diversidade por 10-15 gerações revelou que pelo menos 600 árvores jacarandá são necessárias em cada população.

Tabela 2: Estimativas do índice de fixação (f) em quatro populações de jacarandá-da-bahia a partir de nove locos microssatélites

Locus	Ibicaraí		Barro Preto		Arataca		Uruçuca	
	f	P-valor	f	P-valor	f	P-valor	f	P-valor
Dnig1	0.295	0.0014	0.031	0.4389	0.058	0.3347	0.735	0.0014
Dnig2	0.471	0.0014	0.164	0.0514	0.224	0.0083	0.330	0.0014
Dnig3	0.485	0.0014	0.431	0.0014	1.000	0.0014	0.577	0.0014
Dnig4	-0.008	0.6389	0.089	0.2375	0.349	0.0014	0.427	0.0014
Dnig5	0.06	0.3056	0.164	0.0833	0.186	0.0181	0.195	0.0236
Dnig6	0.485	0.0014	0.622	0.0014	0.414	0.0014	0.224	0.0472
Dnig7	0.051	0.4250	-0.013	0.6083	0.077	0.3153	0.400	0.0014
Dnig9	0.386	0.0014	0.281	0.0028	0.305	0.0014	0.495	0.0014
Dnig10	0.208	0.0722	0.212	0.0222	0.627	0.0014	0.336	0.0056

**=significativo considerando a correção de Bonferroni p-valor= 0,00139

Tabela 3: Estimativas de parâmetros genéticos para quatro populações de jacarandá-da-bahia da região Sul da Bahia a partir da análise de nove locos microssatélites.

	<i>n</i>	<i>NA</i>	<i>npa</i>	<i>H_e</i> (SD)	<i>H_o</i> (SD)	<i>f</i> (p-valor)	<i>N_e</i>	<i>N_e/n</i>	<i>N_e=500</i>
Ibicaraí	35	53	3	0.735(0.0804)	0.532(0.1352)	0.277	27	0.783	639
Barro Preto	35	50	4	0.738(0.0532)	0.573(0.1328)	0.224	29	0.817	612
Arataca	35	57	9	0.751(0.1225)	0.501(0.2135)	0.333	26	0.750	667
Uruçuca	35	53	11	0.746(0.0761)	0.436(0.1198)	0.415	25	0.707	708
Média	-		27	0.742	0.511	0.312	-	-	-

n, tamanho amostral; *Â*, número de alelos por loco; *H_{máx}*, Heterozigosidade máxima; *H_e*, heterozigosidade esperada; *H_o*, heterozigosidade observada; *f*, índice de fixação; *N_e*, tamanho efetivo populacional; (SD), desvio padrão; p-valor ajustado por Bonferroni 0,00139

As estimativas da estrutura da variação genética com base na origem do genótipo de jacarandá-da-bahia foram: $F=0,409$, $\Theta_P=0,142$ and $f=0,311$ (Tabela 4). Considerando que os intervalos de confiança não incluir zero, a hipótese de que os respectivos parâmetros diferem de zero foi aceita. Estas estimativas sugerem um fluxo gênico histórico limitado entre estas populações ($N_{m\Theta P} = 1,425$). Com base na estimativa da estimativa de Θ_P , verificou-se que é necessário conservar a 175 populações de jacarandá-da-bahia semelhantes as que foram avaliadas no presente estudo.

Tabela 4: Estimativas de estrutura genética em quatro populações de jacarandá-da-bahia genotipadas com nove locos microssatélites

	f	Θ_P	F	R_{ST}
	0.311	0.142	0.409	0.168
Upper	0.231	0.111	0.339	-
Lower	0.399	0.173	0.485	-

O valor inferior e superior representa o intervalo obtido com o teste de reamostragens do *bootstrap* (IC 95%).

As estimativas de fluxo gênico por população aos pares estão apresentados na tabela 5. As populações de Arataca e Uruçuca apresentam fluxo gênico baixo, provavelmente por causa da distância entre essas populações, cerca de 80 km. As populações de Ibicaraí e Arataca apresentaram fluxo gênico alto, estas populações estão distantes entre si cerca de 30 km. Esse resultado corrobora com o dendrograma construído pelo método UPGMA a partir das

distâncias genéticas de Nei (1978) entre os pares de populações de jacarandá-da-bahia (Figura 4).

Tabela 5: Estimativas de θ_p (acima da diagonal) e N_m (abaixo da diagonal) em pares de quatro populações de jacarandá-da-bahia da região Sul da Bahia a partir da análise de nove locos microssatélites

	Ibicaraí	Barro Preto	Arataca	Uruçuca
Ibicaraí	–	0.158	0.148	0.183
Barro Preto	11	–	0.113	0.114
Arataca	12	16	–	0.128
Uruçuca	9	16	14	–

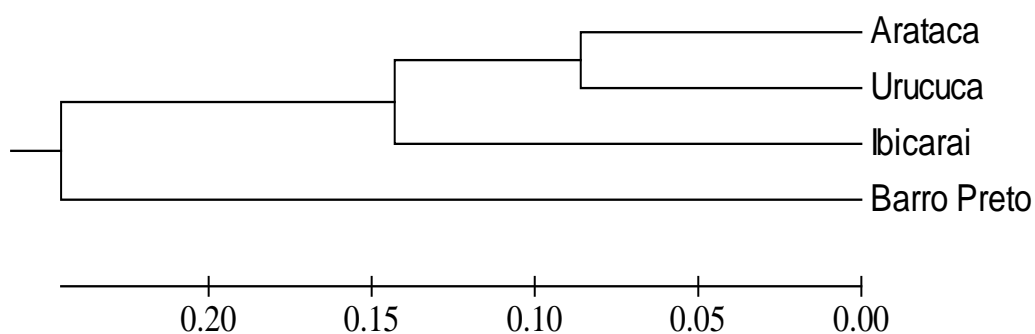


Figura 4: Dendrograma construído pelo método UPGMA a partir das distâncias de Nei (1978) entre os pares de populações de jacarandá-da-bahia genotipados com nove locos microssatélites.

A estrutura genética do jacarandá-da-bahia, sem considerar a origem do genótipo *a priori* indicou que os 140 indivíduos analisados neste estudo formam quatro grupos com $\Delta k=4$ (Fig. 5). A análise Bayesiana indicou que os indivíduos

de jacarandá-da-bahia foram alocados em suas respectivas populações ($\alpha=0,03$): 97% dos indivíduos da população de Ibicaraí foram agrupados no cluster vermelho, 100% dos indivíduos da população Barro Preto foram agrupados no cluster verde, 80% dos indivíduos da população Arataca foram agrupados no cluster azul e 94% dos indivíduos da população de Uruçuca foram agrupados no cluster amarelo (Fig. 7) (considerando-se $Q>0,8$). Na figura 7 os indivíduos são representados por linhas verticais coloridas, a mesma cor em indivíduos distintos indica que eles são do mesmo cluster e cores diferentes em um mesmo indivíduo indica que eles são do mesmo cluster e cores diferentes em um mesmo indivíduo indica a porcentagem do genoma que é herdado de cada cluster. Análise da estrutura (Fig. 7) e o dendrograma (Fig. 8) foram congruentes, mostrando que a análise de agrupamento baseado nas distâncias genéticas de Nei deu origem aos mesmos grupos.

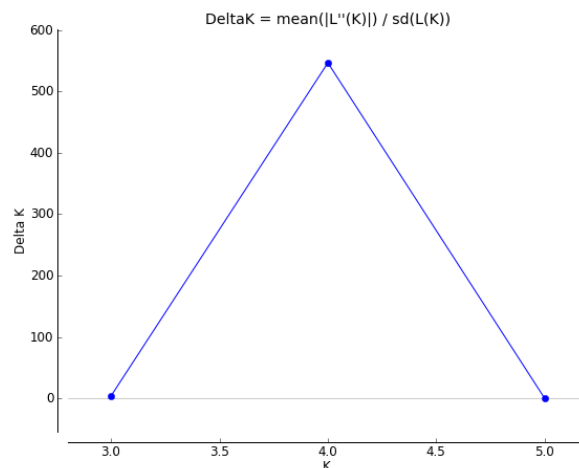


Figura 5: Padrão do ΔK determinado com base na média dos valores de $L(K)$ produzidos para dez repetições conforme o método proposto por Evanno *et al.* (2005).

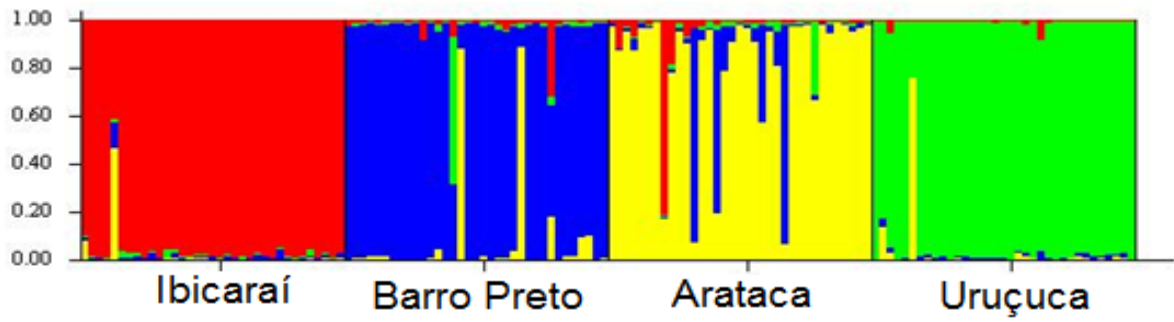


Figura 6: Ancestralidade de 140 indivíduos de jacarandá-da-bahia baseado na probabilidade *a posteriori* de atribuição estimada por meio do programa STRUCTURE.

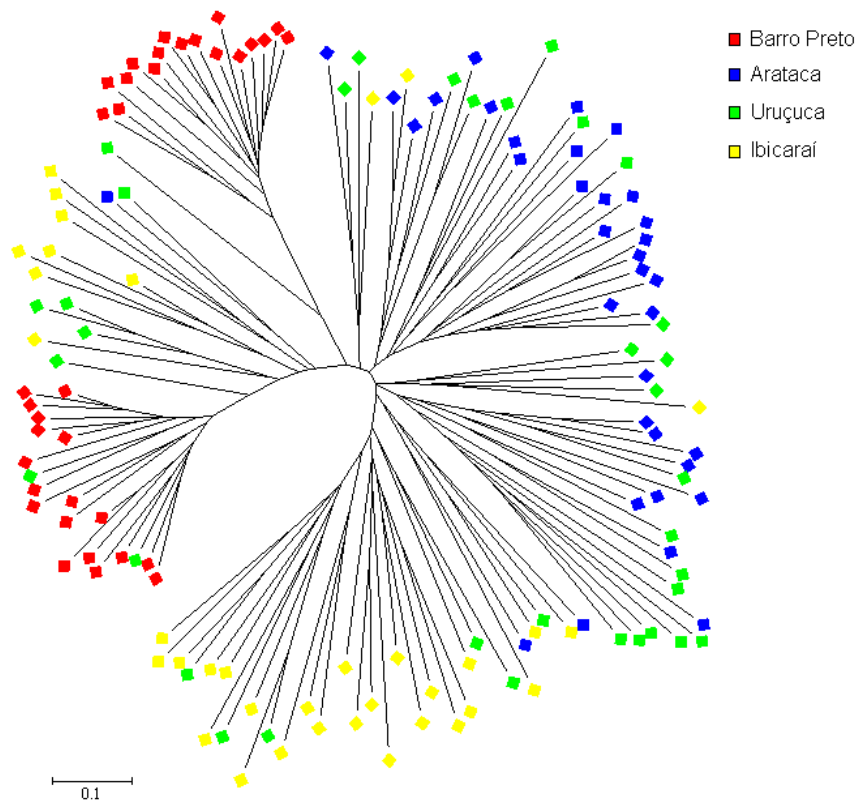


Figura 7: Dendrograma construído pelo método *Neighbor joining* com base nas distâncias genéticas entre os pares de genótipos com relação à proporção de alelos comuns usando o programa MEGA4.

6. DISCUSSÃO

Os nove locos microssatélites desenvolvidos para jacarandá-da-bahia foram eficientes na detecção da diversidade genética das populações amostradas. Esses marcadores têm sido utilizados em análise de genética populacional, uma vez que permitem a detecção de informações sobre o modelo de variabilidade genética, fluxo gênico, sistema de cruzamento e estrutura populacional, possibilitando a elaboração de estratégias de conservação. Em vista disso, têm sido empregados em diversos estudos nessa área (RAPOSO *et al.*, 2007, TARAZI *et al.* 2010, MARTINS *et al.* 2008, TERRAB *et al.* 2006).

Os dados sobre a diversidade genética obtidos neste estudo mostraram que a espécie ainda mantém a variabilidade genética ($H_E = 0,734$), pois detém 90% da máxima diversidade representada. Os parâmetros de diversidade alélica encontrados para jacarandá-da-bahia foram semelhantes aos valores comumente relatados para plantas selvagens analisadas utilizando marcadores microssatélites. Nyboma (2004) revisaram vários estudos de diversidade genética intra-específica em plantas, com uma elevada diversidade biológica e vestígios de

importante porque devido à fragmentação do habitat natural alguns fragmentos florestais ainda retêm importantes reservatórios de árvores de jacarandá-da-bahia com essa magnitude de variabilidade genética. Diante disso, deve-se considerar que a amostragem envolveu indivíduos com DAP acima de 15cm e que foram gerados em diversos vida, baseada em microssatélites, nesta revisão, ele encontrou uma média de um total de 83,2 alelos com $\hat{A}=16$ alelos por locos, diversidade genética $H_E=0,61$ ($DV\pm 0,21$) e heterozigotidade $H_O=0,58$ ($DV\pm 0,22$). O resultado encontrado para jacarandá-da-bahia é importante porque mostra que embora o habitat esteja sob contínua condição de fragmentação, os fragmentos de floresta ainda mantêm algumas reservas importantes de árvores jacarandá-da-bahia com variabilidade genética. No entanto, é importante considerar que a amostragem envolveu indivíduos com DAP acima de 15cm; indivíduos jacarandá-da-bahia com este padrão de crescimento e que provavelmente foram gerada em períodos de floração diferentes ao longo de 30 anos, representam a diversidade genética de um período anterior, portanto, uma fragmentação recente não seria suficiente para causar a perda e/ou fixação de alelos e permitir que os parâmetros de diversidade detectassem os efeitos da deriva genética.

As populações de jacarandá-da-bahia estudadas mostraram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando déficit de heterozigotos. Com o aumento dos homozigotos da população, o fitness fica comprometido, aumentando assim a probabilidade de extinção (LENOMARD, 2002). O déficit de heterozigotos pode derivar de sistema de acasalamento por endogamia biparental ou por efeito Wahlund ou como resultado de alelos nulos. A dispersão de pólen a longa distância e a intolerância a autofecundação são duas estratégias para superar as restrições demográficas e permitir o acasalamento eficiente (LATOUCHE-HALLÉ

et al. 2004). O jacarandá-da-bahia é polinizado principalmente por abelhas (BORTOLUZZI *et al.* 2003, MATHILDE *et al.* 2008), que tendem a restringir o fluxo de pólen em comparação com polinizadores com hábitos de forrageamento. O sistema de dispersão de sementes para jacarandá-da-bahia é do tipo anemocóricas e/ou barocórica (DONADIO; DEMATTÊ 2000) de modo que a dispersão desta espécie é pouco eficaz em termos de distância. Assim, é provável que as sementes germinam próximo a árvore-mãe, o que facilita a formação de famílias. O adulto de jacarandá-da-bahia florescerem e dão frutos no período de 2-3 anos e seu fruto amadurece antes da nova brotação (LEÃO, VINHA 1975, CARVALHO, 1989). Este florescimento supra-anual característicos da espécie também deve ser considerado, porque é comum entre as árvores com longo ciclo de vida e pode intensificar os efeitos da fragmentação (HALL *et al.*, 1996). Os índices de fixação estimados para as populações de jacarandá-da-bahia foram elevadas, variando de -0,008 a 1,000 e provavelmente não estão associados ao sistema reprodutivo. O sistema reprodutivo de jacarandá-da-bahia é, provavelmente, de cruzamento, uma vez que esta espécie apresenta auto-compatibilidade de ação tardia. Assim, o índice de fixação observado pode ter derivado de acasalamentos entre meios-irmãos (0,125) e/ou famílias de irmãos completos (0,25). Alves *et al.* (2003) detectou que 93% dos indivíduos de progênes de polinização aberta eram formados por irmãos completos. A endogamia biparental pode ser a principal razão para explicar o alto índice de fixação em algumas populações jacarandá-da-bahia, mas a ocorrência de efeito Wahlund não pode ser completamente descartado devido a possível existência de subunidades de reprodução temporal no interior das regiões amostradas.

As estimativas de diversidade genética (H_E , H_O e f) entre as populações que sofreram perturbações humanas (Uruçuca e Arataca) e das populações mais conservadas localizadas próximo das RPPNs (Barro Preto e Ibicaraí) foram semelhantes confirmando a alta diversidade genética dentro e entre populações de jacarndá-da-bahia. Isso indica a possibilidade que é possível conservar essas populações *in situ*, pois elas apresentam elevada diversidade. Atualmente, a ocupação humana associada a fragmentação de habitats representam uma das principais causas de erosão da biodiversidade. O conhecimento de seus efeitos é fundamental para o sucesso de programas de conservação. A população de Uruçuca apresentou as maiores estimativas de alelos raros e exclusivos, apoiando assim a hipótese de que a fragmentação e o isolamento favorecem a diferenciação genética. Essa população foi a que mais divergiu das outras populações quando analisadas as distâncias genéticas Nei (1978). Uma população pequena e isolada sofre drasticamente os efeitos da deriva genética, gargalo genético e endogamia em todas as seus locos (ELLASTRAND; ELAM, 1993). Assim, as populações fragmentadas e isoladas tornam-se muito vulneráveis a ameaças de extinção. A redução nas estimativas de heterozigosidade observada, quando comparado com as estimativas de diversidade genética apoia a hipótese de um cruzamento entre indivíduos aparentados.

O tamanho efetivo é um estimador importante nos estudos de estrutura genética, ao passo que contribui para a concepção de estratégias de conservação. Quando há um equilíbrio entre os eventos demográficos, como as flutuações temporais na estrutura da população, estrutura e presença de endogamia dentro das populações, as diferenças de fertilidade, assincronia de

floração, entre outros, os valores de N_e tornam muito próximo do número de indivíduos amostrados. Neste estudo, as estimativas de tamanho efetivo das populações foram inferiores ao número de indivíduos amostrados para cada população, isso leva a conclusão de que os mecanismos para manter o equilíbrio da diversidade nas populações desta espécie foram alterados. O tamanho efetivo da população depende do número de indivíduos que efetivamente contribuem para a reprodução da prole, então, o tamanho efetivo indica a representatividade genética da população (ELLSTRAND; ELAM, 1993). Assim, quando N_e é reduzido, a deriva genética pode ocorrer em curto prazo, até mesmo ao ponto de perder alguns alelos com frequências baixas na população. Em longo prazo, a endogamia resultante do sistema de acasalamento pode ser maior por consequência da maior probabilidade de cruzamento entre indivíduos relacionados em populações com N_e reduzido (KAGEYAMA; GANDARA, 1998, YOUNG *et al.*, 1996). A população deve consistir de um número mínimo de indivíduos (*minimum viable size*, MVP) e precisa de uma área mínima determinada (*minimum area requirement*, MAR) para ter uma chance razoável de sobreviver por um determinado período (BOODY *et al.* 2000). O MVP depende da relação entre o tamanho efetivo populacional (N_e) e real (n). A relação de N_e/n é geralmente entre 0,25 e 1,0 (NUNNEY, 1993) e é desta forma que os gestores de conservação procuram manter a diversidade genética, apesar das populações apresentarem um n pequena. Neste estudo, o MVP foi superior a 0,70, confirmando que existe uma possibilidade de conservar essas populações *in situ*. A fim de conservar e reduzir os efeitos da endogamia em um período de 10 a 15 gerações, é necessário um tamanho efetivo de pelo menos 500 indivíduos (HEDRIK; MILLER, 1992). No caso do jacarandá-da-bahia é necessário manter

pelo menos 600 indivíduos para conservar a diversidade genética por 10 gerações. No entanto, a atual situação da Mata Atlântica, hábitat desta espécie, os indivíduos de jacarandá-da-bahia são encontrados na forma de grupamentos de baixa densidade, portanto, fazer a manutenção desta espécie está cada vez mais difícil.

As estimativas dos parâmetros de estrutura genética, baseados em parâmetros frequentistas, das populações de jacarandá-da-bahia foi alta e significativa ($\Theta_F=0,142$ $P<0,0014$), pode-se dizer que existe 7,4% de variação entre as populações. Os resultados da estrutura genética do jacarandá-da-bahia são consistentes com o modelo de isolamento por distância proposto por Wright (1943). Segundo este modelo, quanto maior a distância entre as populações, mais restrita a dispersão de pólen e sementes, o que favorece o isolamento das populações, como consequência, há um aumento no número de indivíduos relacionados. As populações de jacarandá-da-bahia neste estudo são distantes uma da outra cerca de 80km. Um dos motivos que podem ter contribuído para a estrutura genética observadas nestas espécies de jacarandá-da-bahia pode ser a polinização realizada por insetos, especialmente abelhas (DONADIO; DEMATTÊ, 2000) e a dispersão de sementes, ambos os fatores limitam o fluxo genético e a dispersão por grandes distâncias geográficas. A fragmentação florestal poderia ter sido outro motivo que contribuiu para a estrutura das populações de jacarandá-da-bahia causando a redução do tamanho efetivo e o aumentando o isolamento, com o subsequente aumento da deriva genética, e fluxo gênico limitando ou inexistente entre as populações. Govindaraju (1989) distinguiu três níveis de fluxo gênico: alto ($N_m>1$), intermediário ($0,25<N_m<0,99$) e baixo ($N_m<0,25$). O fluxo gênico aparente neste estudo ($N_m=1,425$) foi alta, de acordo com Wright (1931)

um único migrante por geração é suficiente para evitar os efeitos da deriva genética e da endogamia entre populações pequenas, no entanto, sua ruptura desempenha um papel importante no processo de especiação. Este resultado, portanto, deve ser interpretado com cautela, pois indica que as populações de diferentes regiões, embora geograficamente isolados alelos têm frequências semelhantes e, como resultado de alterações genéticas antiga, ou seja, até passado recente, as populações constituíram uma metapopulação, e atualmente há evidências de processo de isolamento por distância, uma vez que que a hidrografia da região e da distância entre as duas populações, indicam que o fluxo gênico deve ser restrito. As recentes mudanças no fluxo gênico e as taxas de cruzamento em populações fragmentadas correm o risco de não ser detectado por um longo tempo. Os resultados obtidos, juntamente com os registros históricos, sugerem que as populações estão passando por um processo recente de diferenciação, o que significa que algumas gerações passaram no processo de evolução das populações ancestrais. A fragmentação da região é recente, tendo iniciado em 1950 com a construção da BR 101, este tempo é demasiadamente curto para causar deriva genética e endogamia com diferenças mais acentuadas.

Neste estudo, além das estatísticas frequentistas (F_{ST} e N_m) foi usado estatísticas probabilísticas (Bayesiana) para inferir estrutura genética. Os resultados obtidos pela estatística Bayesiana são consistentes com as estimativas dos parâmetros baseado em estatística frequentistas. A ancestralidade $\alpha=0,03$ indica que os 140 indivíduos de jacarandá-da-bahia estão relacionados com suas populações de origem. A divergência encontrada é causada por fatores estocásticos de fragmentação, como o aumento da endogamia, a deriva genética e o fluxo gênico reduzido, entre outros. Os resultados obtidos a partir da análise

da estrutura genética, sem informar a origem geográfica dos indivíduos *a priori* confirma que seria prudente manter os genótipos das populações estudadas. Cada população analisada representa um grupo de indivíduos com genótipos importantes para a conservação, pois representam a diversidade genética da espécie. Assim, faz-se necessário reafirmar a necessidade de criar corredores para manutenção do fluxo de genes que possibilitará a homogeneização das populações. Os resultados obtidos da análise da estrutura com base em estatística probabilísticas (Fig. 3) foram consistentes com o fenograma (Fig. 4) construído a partir das distâncias genéticas de Nei (1978). A utilização de estatísticas probabilísticas em estudos de conservação é uma forma de esclarecer a comunicação dos resultados aos gestores, investidores e formuladores de políticas e, assim, contribuir objetivamente para estratégias de conservação de espécies em risco de extinção. Métodos tradicionais para caracterizar a diferenciação genética entre as populações dependem de uma informação *a priori* do agrupamento dos indivíduos. Métodos de agrupamento Bayesiano exclui essa limitação. Esse método admite o equilíbrio de Hardy-Weinberg, e aloca os indivíduos em grupos homogêneos com base em seus genótipos (LATCH *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos neste estudo são correlacionados com os efeitos estocásticos de fragmentação e pode ser ainda extrapolados para estudos de espécies com características semelhantes. No entanto, para responder com precisão a pergunta feita no início desta dissertação, “qual o estado da diversidade genética de populações de jacarandá-da-bahia em remanescentes de Mata Atlântica do sul da Bahia utilizando marcadores microssatélites?”, é necessário comparar os resultados aqui obtidos com estudos de grandes

populações em áreas de floresta contínua e/ou verificar a ocorrência de estrutura genética espacial através da análise de populações diferentes em um continuum de floresta única. Em trabalhos anteriores, foi verificado que a manutenção de bancos de germoplasma é uma estratégia viável para preservar a diversidade genética de jacarandá-da-bahia, com base nos dados sobre a diversidade do banco de germoplasma da Estação Ecológica Pau-brasil, Porto Seguro, BA (ALMEIDA *et al.*, 2001, JUCHUM *et al.*, 2007). Nossos resultados indicam que as estratégias de conservação devem ser destinadas a todas as populações amostradas, a fim de que a manutenção de um grande número de árvores seja atingível. A manutenção do sistema agroflorestal cabruca é uma alternativa sustentável para a conservação desta espécie, com base nos resultados obtidos. A população amostrada na cabruca e a população amostrada no entorno da RPPN não apresentou diferenças significativas nas estimativas de diversidade e estrutura genética. Uma das dificuldades em manter a conectividade entre fragmentos florestais é a grande distância geográfica entre eles, o que compromete o fluxo de genes. Uma maneira de conectar fragmentos de floresta seria a criação de uma matriz permeável para os polinizadores. O jacarandá-da-bahia é uma árvore muito ornamental e amplamente utilizada em paisagismo por causa de sua folhagem delicada que forma um dossel aberto, além disso é uma planta rústica adaptada às terras secas, sendo excelente para plantios mistos em terrenos perturbados que estão permanentemente protegidos (RÊGO; POSSAMAI, 2003). Esta é uma maneira de criar corredores ecológicos como uma alternativa para preservar a diversidade genética, uma vez que os corredores mantem a conectividade entre os fragmentos.

5. CONCLUSÕES

1. As populações de jacarandá-da-bahia mantêm uma elevada diversidade genética ($H_E=0,734$) e apresentaram uma tendência ao excesso de homozigotos ($H_O=0,499$). Além disso, essas populações mostraram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($f=0,315$), indicando déficit de heterozigotos. O déficit de heterozigotos pode ser explicado pela endogamia biparental.

2. As estimativas de diversidade genética foram similares tanto para as populações mais conservadas (Barro Preto e Ibicarai), quanto para as populações sob forte influência antrópica (Uruçuca e Arataca). Entretanto as estimativas de endogamia direcionam que as causas da perda de heterozigosidade são consequência dos efeitos da fragmentação e da ocupação humana sobre essas populações.

3. As estimativas de tamanho efetivo das populações foram inferiores ao número de indivíduos amostrados para cada população, isso leva a conclusão de que os mecanismos para manter o equilíbrio da diversidade nas populações desta espécie foram alterados

4. O presente estudo indica que as populações de jacarandá-da-bahia estão em processo de estruturação com base em estimativas frequentistas ($\Theta_P=0,142$, $P<0,0014$) que corroboram com as estimativas probabilísticas ($\alpha=0,03$ com $Q>0,8$) e, ainda, com fenogramas construídos com base nas distâncias genéticas de Nei.

5. Os parâmetros genéticos estimados confirmam a necessidade de conservar o jacarandá-da-bahia e dão subsídios numéricos para elaborar estratégias de conservação. Para evitar perda de variabilidade genética e manter estáveis os níveis de endogamia são necessárias medidas que considerem a necessidade de troca gênica entre as populações, como por exemplo, a conexão entre os fragmentos. A manutenção do sistema de cabruca na região do Sul da Bahia é uma maneira de conectar os fragmentos de mata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J.L.; CHAVARRIAGE, P.; KOCHERT, G. (1998) Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, 7:933-944

ALMEIDA, M.O. (2001) Avaliação da diversidade genética de acessos *ex situ* de Jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) por meio de Marcadores RAPD, como subsídio para sua conservação. 2001. Dissertação. 56 folhas. (Mestrado em Desenvolvimento regional e Meio Ambiente) – Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilhéus-BA

ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. (2001) RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismo no DNA. In: MATIOLI, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 143-152p

AVISE, J.C. (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman e Hall, 511p

BEAUMONT, M.A.; RANNALA, B. (2004) The bayesian revolution in genetics. *Genetics*, 5:251-261

BERG, E.E.; HAMRICK, J.L. (1997) Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal of Forest Research*, 27(3):415-424

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (2006) *Marcadores Moleculares*. Viçosa, 374p

BORÉM, A. (2005) Considerações sobre fluxo gênico: Quais são os verdadeiros riscos do escape gênico? *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 34:86-90

BORN, C.; HARDY, O.J.; CHEVALLIER, M.; OSSARI, S.; ATTEKÉ, C.; WICKINGS, E.J.; HOSSAERT-MEKEEY, M. (2008) Small tree species *Aucomia klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. *Molecular Ecology*, 17:2041-2050

BORTOLUZZI, R.L.C.; CARVALHO-OKANO, R.M.; GARCIAS, F.C.P.; TOZZI, A.M.G.A. (2004) Leguminosae, Papilionoideae no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. II: árvores e arbustos escandentes. *Acta Botânica Brasileira*, 18(1):49-71

BOWCOCK, A.M.; RUIZ-LINARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH, E.; KIDD, J.R.; CAVALLI-SFORZA, L.L. (1994). High resolution of human evolution with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368:455-457

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.; PEDROSA, S.; BRONDANI, R.V. (2003) Marcadores microssatélites em espécies vegetais, *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 30:46-50

BURCZYK, J.; DiFAZIO, S.P.; ADAMS, W.T. (2004) Gene flow in forest trees: how far do genes really travel? *Forest Genetics*, 11:1-4

CARVALHO, A.M.V. de. (1990). Os Jacarandás da Bahia. *Agrotrópica* 2:1-10.

CARVALHO, A.M.V. (1992) The genus *Dalbergia* L.f. in Bahia, Brazil. *Herbarium, CEPEC Cocoa Research Center*, 7:6-17

CARVALHO, A.M.V. (1997) A synopsis the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. *Britonia*, 49(1):87-109

CAUJAPÉ-CASTELLS, J. (2010) General G_{ST} and Θ inflation due to biased intra-population sampling and its consequences for the conservations of the Canarian Flora. *Conservation genetics*, 11:709-720

CAVALLI, S.S.; WINGE, H. (2003) Variabilidade genética em populações naturais. In: FREITAS, L.B.; BERED, F. *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: UFRGS, 153p

CHUNG, M.G.; EPPERSON, B.K. (2000) Spacial genetic structure of allozyme polymorphisms in a population of *Eurya japonica* (Theaceae). *Silvae Genetic*, 49(1):1-4

COCKERHAM, C.C. (1969) Variance of gene frequencies. *Evolution*, 23:72-84.

CONDITT, R.; HUBBELL, S.P. (1991) Abundance and DNA sequence of 2-base repet regions in tropical tree genomes. *Genome*, 34:66-71

CORREIA, M.P. (1969-1978) Dicionário das plantas úteis do Brasil: e das exóticas cultiváveis. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 4324p

COSTA, C.M.R.; HERRMANN, G.; MARTINS, C.S.; LINS, L.V.; LAMAS, I.R. (1998) Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 94p

CRONQUIST, A. (1981) Na integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, 1262p.

CROW JF, AOKI K (1984) Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81:6073-6077

DONADIO, N.M.M.; DEMATTÊ, M.E.S.P (2000) Morfologia de frutos, sementes e plântulas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) e jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr.All. ex Benth.) – FABACEAE. Revista Brasileira de Sementes, 22:64-73

DOYLE, J.J.; LUCKOW, M.A. (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiology, 131:900-910

ELLSTRAND, N.C.; ELAM, D.R. (1993) Population genetics on sequences of small population size: implications for plant conservation. Annual Review of Ecology and Systematics, 24: 217-242

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.S. (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J . (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE : a simulation study. Molecular Ecology 14:2611-2620

FALEIRO, F.G.; SCHUSTER, I.; RAGAANIN, V.A.; CRUZ, G.D.; CORRÊA, R.X.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. (2003) Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de locos características quantitativas associados a ciclo e produtividade do feijão-comum. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 38(12):1387-1397

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p

FERREIRA, M.E. (2001) Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: GAREY, I.E.G.; DIAS, B.F.S. Conservação da biodiversidade em sistemas tropicais: avanços, conceitos e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento. Petrópolis: Vozes, 233-267p.

FRANKHAN, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A.; MCLNNES, K.H. (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 280p

FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M E.(1981) Conservation and evolution. London: Cambridge University Press. 327 p.

FREIRE, J.M.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; LIMA, E.R.; SODRÉ, S.R.C.; CORRÊA, R.C. (2007) Estrutura genética de populações de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvu) por meio de marcadores RAPD. Scientia Florestalis, 74:27-35

FUTUYMA, D.J. (1992) Biologia Evolutiva. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 613p

GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. (2003) Genetic structure, mating system and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity*, 94(5):399-406

GALINHO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (2005) Status do hotspots Mata Atlântica: uma síntese. In: GALINHO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 3-11p

GALINHO-LEAL, C.; JACOBSEN, T.R.; LANGHAMMER, P.F.; OLIVIERI, S. (2005) Estado dos hotspots: a dinâmica da perda da biodiversidade. In: GALINHO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 12-23p

GALEUCHET, D.J.; PERRET, C.; FISHER, M. (2005) Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant, *Lychnis flas-cuculi* L., in fragmented landscape. *Molecular Ecology*, 14:991-1000

GARRIS, A.J.; TAI, T.H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; MCCOUCH, S. (2005) Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, 169:1631–1638

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOKS, J. (1974) Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, 39:439-446

GUIMARÃES, M.; ALEXANDRINO J.; HADDAD, C.F.B. (2007) Conservação da biodiversidade. *Ciência Hoje*, 233(39):60-61

GOODMAN, S.J. (1997) R_{ST}Calc: a collection of computer program for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite and determining their significance. *Molecular Ecology*, 6:881-885

GOUDET, J. (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity*, 86:485–486

HALL, P.; WALKER, S.; BAWA, K. (1996) Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. *Conservation Biology*, 10:757-768

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; SHERMAN-BROYLES, S.L. (1992) Factores influencing levels of genetics diversity in woody plants species. *New Forests*, 6:95-124

HAMRICK, J.L. (1989) Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations . In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P. Isozymis and analysis of genetic structure in plant populations. New York: Chapman and Hall, 87-105p

HAMRICK, J.L.; LOVELLESS, M.D. (1986) Isozyme variation in tropical trees: producers and preliminary results. *Biotropica*, 18(3):201-207

HAMRICK, J.L. (1982) Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany*, 69(10):1685-1693

HEDRICK, P.W. (2001) *Genetics of populations*. Boston: Jones and Bartlett Publishers. 553p

HEDRICK, P.W.; MILLER, P.S. (1992) Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecological Applications*, 2:30-46

HOLSINGER, K.E.; WALLACE, L.E. (2004) Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Plantanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*, 13: 887-894

IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente. (2008) Instrução Normativa de 19 de Setembro de 2008, O IBAMA torna pública a Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. IBAMA

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11:424-429

JUCHUM, F.S.; LEAL, J.B.; SANTOS, L.M.; ALMEIDA, M.P.; AHNERT, D.; CORRÊA, R.X. (2007) Evaluation of the genetic diversity in a natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research*, 6(3):543-553

JUDD, W.S.; RELLOGG, E.A.; CAMPBELL, C.S.; STEVENS, P.F.; DONOGUE, M.J. (2002) Plant Systematics: a phylogenetic approach. 2ª edição. Sunderland, Massachusetts(MA), USA: Sinauer Associates, 576p

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B. (1998) Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. Série Técnica IPEF, 32(12):65-70

KENTA, T.; ISAGI, Y.; NAKAGAWA, M.; YAMASHITA, M.; NAKASHIZUKA, T. (2004) Variation in pollen dispersal between years with different pollination conditions in a tropical emergent tree. *Molecular Ecology*, 13:3575–3584

LAGOS, A.R.; MULLER, B.L.A. (2007) Hotspot brasileiro: Mata Atlântica. *Saúde e Ambiente em revista*, 2(2):35-45

LEÃO, A.C. e VINHA, S.G. (1975) Ocorrência de Jacarandás no Sul da Bahia. *Cacau Atualidades*, 12(4):22-27

LENOMARD, T. (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology E Evolution*, 17(4):183-189

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. (2002) Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data. GDA Version 1.0 (d15)

LITT, M.; LUTY, J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. American Journal of Human Genetics, 44:398-401

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.S.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. (2002) Marcadores moleculares dominantes (RAPD e Aflp). Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, 29:56-60

LORENZI, H. (1992) Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, 368p

MALUF, M.P.; SILVESTRINI, M.; RUGGIERO, L.M.C.; FILHO, O.G.; COLOMBO, C.A. (2005) Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. Scientia Agricola, 62(4):366-373

MARCHIORI, J.N.C. (1997) Dendrologia das Angiospermas: leguminosas. Santa Maria: UFMS,.200p

MARTNS, K. (2005) Diversidade genética e fluxo gênico via pólen e semente em populações de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) no Sudeste de Goiás. 2005. Tese. 141 folhas. (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo – USP

MARTINS, P.S. (1987) Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”.
Série Técnica IPEF, 35:71-78

MARTINS, K.; SANTOS, J.D.; GAIOTTO, F.A.; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, PY.
(2008) Estrutura genética de *Copaifera langsdorffi* Desf. (Leguminosae –
Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no pontal do Paranapanema, SP,
Brasil. Revista Brasileira de Botânica, 31(1):61-69

MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; ZIZUMBO-VILLARREAL, D.; GEPTS, P.; MARÍN, P.C.
(2007) Gene flow and genetic structure in the wild–weedy–domesticated complex
of *Phaseolus lunatus* L. In its mesoamerican center of domestication and diversity.
Crop Science, 47:58-66

MATHILDE, I.; OLIVEIRA, B.; SIGRIST, M.R. (2008) Fenologia reprodutiva,
polinização e reprodução de *Dipteryx alata* Vogel (Leguminosae-Papilionoideae)
em Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, 31:95-207

MELO, S.C.O.; GAIOTTO, F.A.; CUPERTINO, F.B.; COORÊA, R.X.; REIS,
A.M.M.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R.P.V. (2006) Microsatellite markers
for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country.
Conservation Genetic, 8:1269-1271

MISSIAGGIA, A.; GRATTAPAGLIA, D. (2006) Plant microsatellite genotyping with
4-color fluorescent detection using multiple-tailed iniciadores. Genetics and
Molecular Research 5:72-78

MMA - Ministério do Meio Ambiente (2000). Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. MMA, Brasília

MORAES, M.L.T.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. (2005) Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Sob diferentes condições antrópicas. Revista Árvores, 29(2):281-289

MÜHLEN, G.S.; MARTINS, P.S.; ANDO, A. (2000) Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. Scientia Agricola, 57(2):319-328

MULLIS, K.; FALOONA, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. Methods Enzymology, 55:335-350

NEI, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89(3):583-590

NEI, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 70:3321-3323

NEI, M. (1997) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Annals of Human Genetics, 41:225-233

NEI, M.; KUMAR, S. (2000) Molecular evolution and phylogenetics. New York, Oxford, 333 p.

NEIGEL, J.E. (1997) A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. Annual Review Ecology Systematics, 28:105-128

NOVAES, R.M.L. RODRIGUES, J.G.; LOVATOM. B. (2009) An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of leguminosae trees. Genetic and Molecular research, 8(1):86-96

OETTING, W.S.; LEE, H.K.; FLANDERS, D.J.; WIESNER, G.L.; SELLERS, T.A.; KING, R.A. (1995) Linkage Analysis with Multiplexed Short Tandem Repeat Polymorphism Using Infrared Fluorescence and M13 Tailed Inicialdores. Genomics, 30:450-458

OLIVEIRA, M.I.B.; SIGRIST, M.R. (2008) Fenologia reprodutiva, polinização e reprodução de *Dipteryx alata* Vogel (Leguminosae-Papilionoideae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, 31(2,):195-207

OOSTERHOUT, C.V.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes, 4:535-538

PARK, S. (2001) MS TOOLS. Version 3. [<http://acer.gen.tcd.ie/sdepark/ms-toolkit>]

- PEARSE, D.E.; CRANDALL, K.A. (2004) Beyond FST: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, 5: 585–602
- PETIT, R.J.; HAMPE, A. (2006) Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 37:187-204
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P.J. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959
- PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. (2001) *Biologia da conservação*. Londrina: E. Rodrigues, 328p
- RAPOSO, A.; MARTINS, K.; CIAMPI, A.Y.; WADT, L.H.O.; VEASEY, E.A.. (2007) Diversidade genética de populações de andiroba no baixo Acre. *Pesquisa Agrotópica Brasileira*, 42(9):1291-1298
- RÊGO, G.M.; POSSAMAI, E. (2003) Jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* Vellozo) Leguminosae – Papilionoideae: produção de mudas. Colombo: Embrapa Florestas, 1-3. (Comunicado Técnico, 106)
- REIS, M.S. (1996) Dinâmica da movimentação de alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais de plantas. *Brazilian Journal of Genetics*, 19(4):37-47

REIS, R.L.; MUNIZ, J.A.; SILVA, F.F.; SÁFADI, T.; AQUINO, L.H. (2008) Inferência Bayesiana na análise genética de populações diplóides: estimação do coeficiente de endogamia e da taxa de fecundação cruzada. *Ciência Rural*, 38(5):1258-1265

RIBEIRO, R.A.; RAMOS, A.C.S.; LEMOS FILHO, J.P. DE; LOVATO, M.B. (2005) Genetic variation in remnant populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae) on endangered tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Annals of Botany*, 95:1171-1177

RIBEIRO, R.A.; REZENDE, M.F.S.; RESENDE, LUCIANA C.; LEMOS-FILHO, J.P.; KALAPOTHAKIS, E.; LOVATO, M.B.. (2008) Development of polymorphic microsatellite markers for *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an endangered tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology Resources*, 9(1):203-206

RICKLEFS, R.E. (2003) *A economia da natureza*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 503p

RIDLEY, M. (2006) *Evolução*. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed. 752p

RIZZINI, C.T. (1986) *Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira*. 2ª edição. São Paulo: Edigard Blucher, 296p

SANZ, M.A.; GRIMWADE, D.; TALLMAN, M.S.; LOWENBERG, B.; FENAUX, P.; ESTEY, E.H.; NAOE, T.; LENGFELDER, E.; BUCHNER, T.; DOHNER, H.; BURNETT, A.K.; LO COCO, F. (2009) Guidelines on the management of acute

promyelocytic leukemia: Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 113: 1875–1891

SCHIERENBECK, K.A.; SKUPSKI M; LIEBERMAN, D.; LIEBERMAN, M. (1997) Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Molecular Ecology*, 6:137-144

SEBBENN, A.M.; SEOANE, C.E.S. (2005) Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. *Rev. Árvore*, 29(1):1-8

SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M.S.; BAWA, K.; SEBBENN, A.M. (2005) Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estruturação genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart.. *Revista do Instituto Florestal*, 17(1):25-43

SEOANE, C.E.S; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBEN, A.M. (2000) Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). *Scientia Forestalis*, 57:123-139

SIMPSON, M.G. (2006) *Plant Systematics*. San Diego, Califórnia, EUA: Elsevier Academic Press, 590p

SILVA, C.M.; KARASAWA, M.M.G.; VENCOVSKY, R.; VEASEY, E.A. (2007) Elevada diversidade genética interpopulacional em *Oryza glumaepatula* Steud. (Poaceae) avaliada com microssatélites. *Biota Neotropica*, 7(2):165-171

SLATKIN, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*.139:457-462

SOLÉ-CAVA, A.M. (2001) Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 172-182p

SOLFERINI, V.N.; SELIVON, D. (2001) Polimorfismo de Isoenzimas. In: MATIOLI, S.R. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 137-142p

SORK, V.L.; SMOUSE, P.E. (2006) Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape ecology*, 21: 821-826

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. (2005) *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseada em APG II*. Nova dessa: Instituto Plantarum, 443p

TABARELLI, M.; AGUIAR, A.V.; GRILLO, A.S.; SANTOS, M.M. (2006) Fragmentação e perda de habitats na Mata Atlântica ao Norte do Rio São Francisco. In: FILHO, J.A.S.; LEME, E.M.C. *Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste: biodiversidade, conservação e suas bromélias*. Rio de Janeiro: Andréa Jakobson Estúdio, 154p

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599

TARAZI, R.; MORENO, M.A.; GANDARA, F.B.; FERRAZ, E.M.; MORAES, M.L.T.; VINSON, C.C.; CIAMPI, A.Y.; VENCOVSKY, R.; KAGEYAMA, P.Y. (2010) High levels of genetic differentiation and selfing in the Brazilian cerrado fruit tree *Dipteryx alata* Vog. (Fabaceae). *Genetic and Molecular Biology*, 33(1):78-85

TERRAB, A.; PAUN, O.; TALAVERA, S.; TREMETSBERGER, K.; ARISTA, M.; STUESSY, T.F. (2006) Genetic diversity and populations structure in natural populations of Moroccan Atlas cedar (*Cedrus atlantica*; Pinaceae) determined with cpSSR markers. *American Journal of Botany*, 93(9):1274-1280

TISSOT-SQUALLI, M.L. (2006) *Introdução à Botânica e Sistemática*. Ijuí: Unijuí, 144p

VARTY, N. (2006) *Dalbergia nigra*: IUCN 2006. IUNC Red list of threatened species. Disponível em <<http://www.iuncredlist.org>>. Acessado em Junho de 2010

VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. (1999) Variance effective population size under mixed self and random mating with application to genetic conservation of species. *Crop Science*, 39:1282-1294

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M. VAN de LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. (1995) AFLp: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, in press

WEIR, B.S. (1996) *Genetic Data Analysis II*. Sunderland: Sinauer Associates

WILSON, E.O. (1997) A situação da diversidade biológica. In: WILSON, E. O. *Biodiversidade*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 3-23p

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary iniciadores are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Research*. 22(18):6531-6535

WHITE GM, BOSHIER DH, POWELL W (1999) Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology*, 8:1899-1909

WRIGHT, S. (1931) Evolution in mendelian population. *Genetics*, 16:97-159

WRIGHT, S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19:395-420

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

WRIGHT, S. (1943) Isolation by distance. *Genetics*, 38:114-138

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROW, T. (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecology Evolution*, 11:413-418

ANEXO I

Tabela 1: Frequências alélicas em quatro populações de jacarandá-da-bahia genotipadas com nove locos microssatélites.

	Ibicaraí	Barro Preto	Arataca	Uruçuca
Loco Dnig1			0.329	
p: 241		0.100		
p: 247	0.114		0.243	0.286
p: 249		0.086		
p: 253				0.343
p: 255	0.743		0.257	0.343
p: 257	0.067	0.014	0.114	0.014
p: 259	0.086	0.014	0.086	0.086
p: 261	0.114	0.129	0.114	0.386
p: 263	0.014		0.114	0.067
p: 265	0.014	0.029	0.743	
Loco Dnig2				
p: 152	0.050	0.057	0.015	
p: 154	0.050	0.015	0.114	
p: 156	0.050			0.014
p: 158	0.033			
p: 160	0.067	0.015	0.114	
p: 162	0.083	0.015		
p: 164		0.071	0.017	
p: 168	0.067	0.057		
p: 170	0.067	0.086		
p: 190	0.061	0.071	0.033	
p: 192		0.015	0.017	0.014
p: 194	0.100		0.045	
p: 196	0.050	0.015		
p: 204		0.043	0.106	
p: 206	0.050		0.076	0.014

p: 208	0.050	0.071	0.061	0.057
p: 210		0.186	0.152	
p: 212	0.067	0.071	0.091	
p: 214			0.121	
p: 218	0.271	0.045	0.071	
p: 220	0.050	0.045	0.043	0.014
p: 236		0.014		
p: 238	0.050	0.414	0.100	0.014
p: 241			0.015	
p: 244	0.100		0.091	

Loco Dnig3

p: 174	0.243			
p: 182				0.043
p: 184	0.077		0.167	0.343
p: 186	0.086	0.686	0.258	0.186
p: 188		0.314	0.333	0.257
p: 190	0.114		0.091	0.100
p: 192				0.014
p: 194				0.014
p: 196	0.014		0.121	0.514
p: 204	0.243			
p: 208			0.030	0.029

loco Dnig4

p: 197				0.141
p: 205		0.063		
p: 207	0.121	0.297	0.212	0.031
p: 209		0.094	0.115	0.031
p: 211		0.016		
p: 217		0.016		
p: 219	0.229	0.148	0.077	0.037
p: 221	0.186	0.019	0.096	0.016
p: 223	0.100	0.047	0.038	0.056

p: 233		0.078		
p: 235	0.071	0.093	0.243	0.093
p: 237	0.121	0.078	0.231	0.315
p: 239	0.171	0.078	0.154	
p: 241	0.038	0.016	0.204	0.037

Loco Dnig5

p: 236	0.045	0.015	0.094	0.014
p: 238	0.071	0.045		0.045
p: 244	0.016	0.043	0.109	0.014
p: 246		0.045	0.044	0.114
p: 248		0.152	0.088	0.243
p: 250				0.029
p: 254				0.129
p: 256	0.086	0.030	0.029	
p: 258	0.045	0.015	0.438	0.029
p: 260			0.162	
p: 266	0.031	0.086		0.014
p: 268		0.086	0.029	0.044
p: 270	0.071	0.030	0.044	0.029
p: 272		0.182	0.221	0.014
p: 274	0.031	0.106	0.234	0.015
p: 276		0.015	0.029	0.043
p: 278	0.016	0.045		0.057
p: 280	0.071	0.106	0.074	0.014
p: 282	0.031		0.074	
p: 284	0.030	0.061	0.059	
p: 288		0.094	0.044	0.029

Loco Dnig6

p: 263	0.757	0.519	0.482	0.419
p: 265	0.061	0.093	0.214	0.226
p: 267	0.071	0.167	0.125	0.210
p: 269	0.243	0.222	0.179	0.145

Loco Dnig7

p: 198	0.071	0.111	0.217	0.329
p: 200	0.061		0.036	0.114
p: 202				0.029
p: 204		0.130		
p: 206			0.067	
p: 208	0.071	0.278	0.300	0.471
p: 210	0.514	0.057	0.250	0.037
p: 216		0.111		
p: 220	0.486	0.333	0.100	0.061

Loco Dnig9

p: 216	0.196	0.117	0.015	0.014
p: 218	0.071	0.100	0.029	0.029
p: 220	0.129	0.150	0.150	0.029
p: 224	0.088	0.088	0.029	0.014
p: 226			0.015	0.014
p: 232	0.229	0.118		0.057
p: 234	0.100	0.118		0.061
p: 236		0.036		0.014
p: 248	0.061		0.111	
p: 250	0.014	0.147		0.061
p: 252	0.243	0.147		
p: 256	0.089	0.133	0.015	0.014
p: 258	0.179	0.100	0.015	0.029
p: 260	0.357	0.150		0.071
p: 262	0.054	0.103	0.015	
p: 264				0.111
p: 266	0.061	0.017	0.029	0.043
p: 268	0.018	0.017		
p: 270	0.086	0.017	0.029	

Loco Dnig10

p: 251		0.020		
p: 257		0.140		
p: 261	0.061	0.200		
p: 263	0.096			0.154
p: 265	0.061	0.120	0.109	0.217
p: 267	0.346	0.200	0.328	0.333
p: 269	0.058	0.160	0.063	0.133
p: 271	0.173	0.160	0.203	0.183
p: 273	0.058		0.094	0.100
p: 275	0.115		0.063	
p: 277	0.033		0.141	

Anexo II

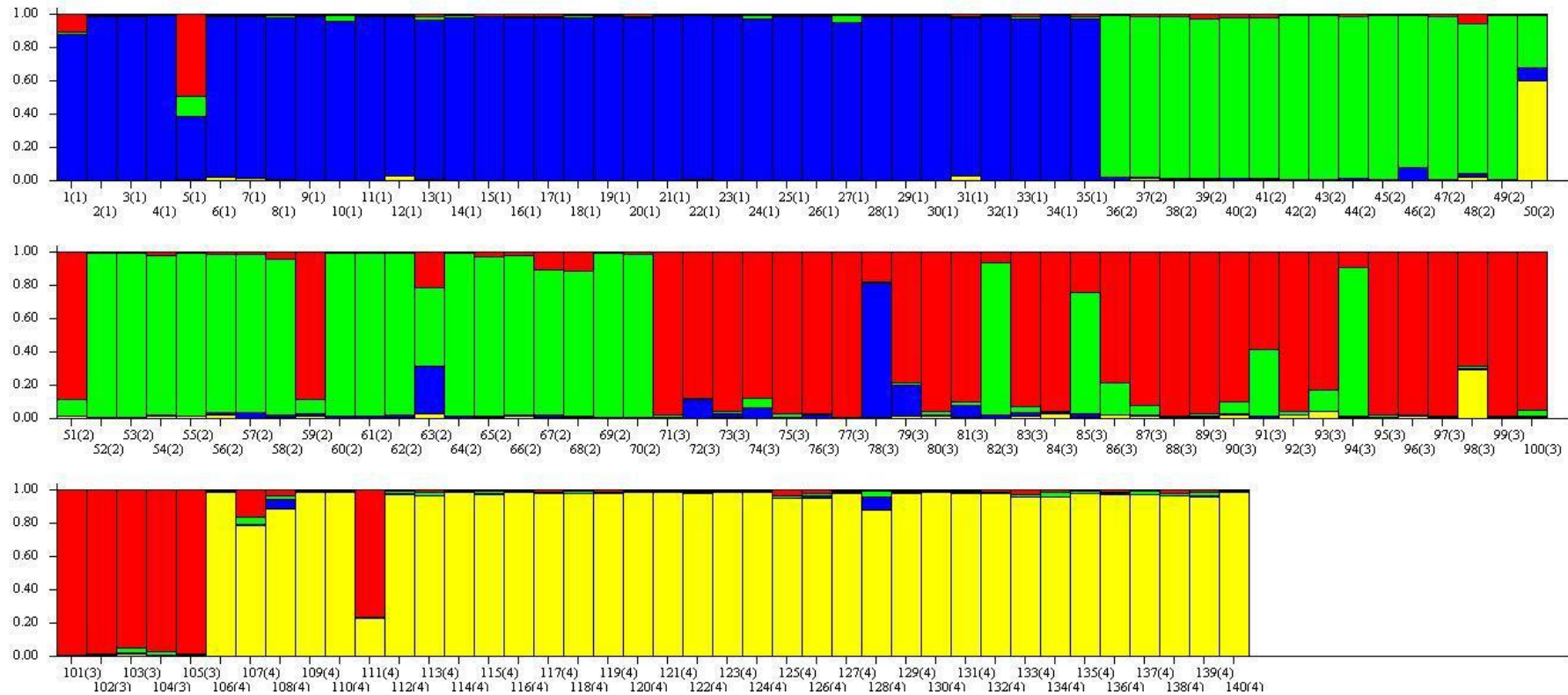


Figura 1: Ancestralidade de 140 indivíduos de jacarandá-da-bahia baseado na probabilidade *a posteriori* de atribuição estimada por meio do programa STRUCTURE