

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**



**DIVERSIDADE, FLUXO GÊNICO, ESTRUTURA GENÉTICA**  
**ESPACIAL E CONSERVAÇÃO DE *Plathymenia reticulata* NA**  
**PAISAGEM AGROFLORESTAL CACAUEIRA -“CABRUCAS”**

**FERNANDA ANCELMO DE OLIVEIRA**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Fevereiro de 2012**

**FERNANDA ANCELMO DE OLIVEIRA**

**DIVERSIDADE, FLUXO GÊNICO, ESTRUTURA GENÉTICA  
ESPACIAL E CONSERVAÇÃO DE *Plathymenia reticulata* NA  
PAISAGEM AGROFLORESTAL CACAUEIRA -“CABRUCAS”**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Área de concentração:** Genética e Biologia Molecular.

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Fevereiro de 2012**

- O48 Oliveira, Fernanda Ancelmo.  
Diversidade, fluxo gênico, estrutura genética espacial e conservação de *Plathymenia reticulata* na paisagem agro-florestal cacaueteira – “cabruças” / Fernanda Ancelmo de Oliveira. - Ilhéus : UESC, 2012.  
x, 80f. : il.  
Orientadora : Fernanda Amato Gaiotto.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação Genética e Biologia Molecular.  
Inclui bibliografia.
- 1.Mata atlântica – Biodiversidade – Bahia, sul, região.  
2.Biodiversidade – Conservação. 3. Agrosilvicultura – Bahia, sul, região. 4. Florestas. I. Gaiotto, Fernando Amatto.  
II. Título.

CDD – 581.35

FERNANDA ANCELMO DE OLIVEIRA

DIVERSIDADE, FLUXO GÊNICO, ESTRUTURA GENÉTICA  
ESPACIAL E CONSERVAÇÃO DE *Plathymenia reticulata* NA  
PAISAGEM AGROFLORESTAL CACAUEIRA -“CABRUCAS”

Dissertação apresentada à Universidade  
Estadual de Santa Cruz, como parte das  
exigências para obtenção do título de Mestre  
em Genética e Biologia Molecular.

**Área de concentração:** Genética e Biologia  
Molecular.

APROVADA: 29 de fevereiro de 2012

Dra. Maria Bernadete Lovato  
(UFMG)

Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo  
(CENARGEN-EMBRAPA)

Dra. Deborah Maria de Faria  
(UESC)

Dra. Fernanda Amato Gaiotto  
(UESC - Orientadora)

*“No final, nossa sociedade será definida não somente pelo que criamos, mas pelo que recusamos destruir. A escolha é sua.”*

**John Sawhill**  
*(The Nature Conservancy)*

*Durante muito tempo tive um sonho... ser Geneticista!  
Hoje, esse sonho se torna possível a partir deste trabalho.  
A todos aqueles que conservam o mesmo desejo...*

**DEDICO**

---

## AGRADECIMENTOS

---

Em primeiro lugar a Deus, por tornar possível a realização desse sonho, pela saúde e força para vencer os obstáculos dessa caminhada, por todas as suas bênçãos em minha vida.

À minha mãe Gracielite, meu “paidrasto” Amaro, minhas irmãs Graciele e Thaíze, meus sobrinhos Giovanna, Guilherme e Levi. A toda minha família. Por todo amor e apoio incondicional. Amo muito todos vocês!

Ao meu namorado Edson, por todo apoio e compreensão em minha decisão de realizar esse trabalho, demonstrando acima de tudo, seu companheirismo e amizade durante esses dois anos que passamos distantes. Tempo que só me fez confirmar o quanto és especial para mim. “Mozinho, te amo!”

\* \* \*

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela infraestrutura, todos os professores e funcionários.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela contribuição à minha formação.

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

À Coordenação de Apoio à Formação de Pessoal em Ensino Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo financiamento do projeto.

À Profa. Dra. Fernanda Amato Gaiotto, um exemplo de profissional, humana e amiga... uma super orientadora! Agradeço por ter acreditado em mim e por ajudar-me a continuar no caminho que escolhi seguir: a carreira científica. Tanto através da realização desse mestrado, como abrindo as portas para o doutorado que está por vir. Muito obrigada por tudo Fê!!!

Ao Dr. Roberto Tarazi pela co-orientação, amizade e diversas palavras de incentivo.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), especialmente ao Prof. Dr. Cássio van den Berg, pela parceria, por disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LAMOL). E ainda, a Ma. María Cristina López Roberts por todo auxílio e amizade concedida durante o período que permaneci na UEFS.

À Fabrícia Santos, Analista Administrativo do PPG-GBM, pela paciência e simpatia em todas as vezes que precisei do seu auxílio (e não foram poucas).

Aos pesquisadores, funcionários e amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares: especialmente Ma. Jeiza Leal, grande amiga, por todo auxílio no laboratório e por me apoiar nos momentos de desespero; Ramiris Moraes, pela ajuda inestimável nas coletas, pela grande amizade e palavras de incentivo; Caio Damasceno, pelas longas conversas e apoio durante todo o mestrado; Me. Ivandilson Menezes, pela atenção e por ser tão prestativo todas as vezes que o procurei; Josiane Amorim, pelas boas conversas e companhia nas coletas; Rodrigo; Acácia; Rebeca; Douglas; Daniela e Flora, cada um foi único.

Ao Alesandro Santos (estudante de Iniciação Científica), pela companhia em laboratório, por ter colaborado de forma essencial nas coletas e pela amizade!

À Elisabeth Amaral, por me acompanhar em todas as coletas, tarefa que não foi fácil. Enfrentamos sol, chuva, subidas, descidas e muitos mosquitos e carrapatos... mas você sempre estava lá! Obrigada pela amizade acima de tudo, te adoro!

Ao Técnico José Lima da Paixão, pelo auxílio nas coletas que, apesar de tensas, foram muito divertidas. O que permitiu o início de uma ótima amizade. Obrigada pela ajuda fundamental!

À minha amiga “irmã” Bruna Melo, pelo companheirismo nesses seis anos de amizade, por toda sua atenção e paciência, por me apoiar nos momentos difíceis, por estar ao meu lado nessa trajetória, que juntas, decidimos traçar na Biologia. Você é muito especial para mim, obrigada!

Aos colegas de turma: Eric Marques, Lívia Santos, Caio Damasceno, Raoni Ferreira, Ronaldo Silva, Romaria Araújo, Dayse Santana, Gileno Lacerda, Sanderson Souza, Ricardo Porto, Dayanne Almeida, Allan Pereira, Ivanildes Santos e aos colegas do doutorado que também fazem parte dessa turma Cláudio Melo e Miguel Ribeiro.

Em especial, Cintia Marques, Jamille Oliveira e Thiago Silva, pela grande amizade e apoio nos momentos tristes e nos momentos de conquistas. Adoro demais vocês!

A todos aqueles que, mesmo não citados, contribuíram direta ou indiretamente para realização desse grande sonho, por isso, são também muito importantes para mim.

*Muito obrigada!!!*



---

## ÍNDICE

---

EXTRATO.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
A espécie <i>Plathymenia reticulata</i> .....	4
A Mata Atlântica no sul da Bahia.....	8
Sistema agroflorestal “Cabruças” .....	9
Cabruças – abordagem histórica.....	10
Consequências genéticas do corte em espécies arbóreas.....	12
Diversidade genética e o papel da Genética da Conservação.....	13
Fluxo Gênico.....	15
Estimativas do Fluxo Gênico.....	16
Estrutura Genética Espacial.....	18
Microsatélites.....	20
Desenvolvimento de microsatélites.....	23
CAPÍTULO 1: Microsatellite Markers for <i>Plathymenia reticulata</i> (Leguminosae).....	25
Abstract.....	26
1. Introduction.....	26
2. Methods and Results.....	27
3. Conclusions.....	29
4. Literature Cited.....	30
CAPÍTULO 2: Estrutura genética espacial de vinhático ( <i>Plathymenia reticulata</i> , <i>Leguminosae</i> ) em sistema agroflorestal cacauzeiro - “cabruças” do sul da Bahia, Brasil.....	31
Resumo.....	32
1. Introdução.....	33
2. Material e Métodos.....	36
3. Resultados.....	45
4. Discussão.....	51
5. Referências bibliográficas.....	60
CONCLUSÕES GERAIS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES.....	68

---

## EXTRATO

---

Oliveira, Fernanda Ancelmo, MS; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, fevereiro de 2012. **Diversidade, fluxo gênico, estrutura genética espacial e conservação de *Plathymenia reticulata* na paisagem agroflorestal cacauieira -“Cabruças”**. Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Amato Gaiotto. Co-orientador: Dr. Roberto Tarazi.

A manutenção da diversidade genética é um dos principais focos da genética da conservação, pois é ela que fornece o potencial evolutivo de uma espécie. Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse em compreender as consequências genéticas causadas pela exploração de espécies arbóreas madeireiras e pela fragmentação de hábitat na composição genética de populações de plantas. Os sistemas agroflorestais vêm demonstrando capacidade para prevenir a erosão genética em ambientes impactados, através da conexão entre fragmentos florestais com o restabelecimento do fluxo gênico. A Mata Atlântica do sul do estado da Bahia, com sistemas agroflorestais baseados na cultura do cacau “cabruças”, sombreado com espécies arbóreas nativas, caracteriza-se como um cenário perfeito para quantificar o impacto da perturbação humana em populações de espécies arbóreas. *Plathymenia reticulata* Benth. é uma das espécies dominantes nas cabruças. Conhecida como “vinhático”, apresenta valor econômico e importante papel ecológico, com alto potencial de regeneração em áreas degradadas e madeira de alta qualidade. Devido à perda de hábitat e exploração, encontra-se vulnerável à extinção. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as consequências genéticas da cabrucagem em populações de *P. reticulata* em sistemas agroflorestais - cabruca. Para tal, o presente estudo foi desenvolvido em duas etapas apresentadas em dois capítulos: no capítulo 1, foi realizado o isolamento e caracterização de marcadores microssatélites (SSR) inéditos, polimórficos e específicos para a espécie. No capítulo 2, os SSR desenvolvidos, foram utilizados nas análises de diversidade, fluxo gênico e estrutura genética espacial (EGE) de indivíduos de *P. reticulata* provenientes de quatro populações, duas de unidades de conservação e duas de cabruças, do sul da Bahia, Brasil. Os resultados revelaram modificações nos padrões genéticos de distribuição espacial de indivíduos. Por fim, discute-se o potencial impacto da cabrucagem para as populações de *P. reticulata* e são apresentadas novas perspectivas para a adoção de estratégias para conservação *ex situ* da espécie.

**Palavras-chave:** Vinhático. Mata Atlântica. Sistema agroflorestal. Microssatélite. Estrutura Genética Espacial.

---

## ABSTRACT

---

Oliveira, Fernanda Ancelmo, MS; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, February, 2012. **Genetic diversity, gene flow, spatial genetic structure and conservation of *Plathymenia reticulata* in cocoa agroforestry landscape - "Cabruca."** Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Amato Gaiotto. Co-orientador: Dr. Roberto Tarazi.

The maintenance of genetic diversity is a major focus of the conservation genetics, because it is providing the evolutionary potential of a species. In recent years there has been a growing interest in understanding the genetic consequences caused by the exploitation of timber tree species and habitat fragmentation on the genetic composition of plant populations. The agroforestry systems have demonstrated ability to prevent genetic erosion in environments impacted by the connection between forest fragments and restoration of gene flow. The Atlantic Forest of southern Bahia state, based in agroforestry systems in the cocoa crop "cabruças", is characterized as a perfect setting to quantify the impact of human disturbance on populations of tree species. *Plathymenia reticulata* Benth. is one of the dominant species in the cacao plantations. Known as "vinhático" it has great ecological and economical importance, with high potential for regeneration in degraded areas and high quality wood. Due to habitat loss and selective logging, is vulnerable to extinction. In this context, the objective of this study was to evaluate the genetic consequences of selective logging on populations of *P. reticulata* in agroforestry systems cabruca. This study was done in two chapters: Chapter 1, we performed the isolation and characterization of microsatellite markers (SSR) unpublished and polymorphic, specific for the species. In Chapter 2, the developed SSR, were used in diversity analysis, gene flow and spatial genetic structure (EGE) from individuals of *P. reticulata* from four populations, two conservation units and two cabruças, southern Bahia, Brazil. The results revealed changes in the genetic patterns of spatial distribution of individuals. Finally, we discuss the potential impact of selective logging for the populations of *P. reticulata* and we presented new opportunities for the adoption of effective strategies for conservation of the species.

**Keywords:** Vinhático. Atlantic rain forest. Agroforestry system. Microsatellite. Spatial genetic structure.

---

## INTRODUÇÃO

---

A espécie *Plathymenia reticulata* Benth. popularmente conhecida como vinhático, é uma arbórea tropical, típica de dossel, pertencente a família Leguminosae (Mimosoideae). *Plathymenia* é um gênero monoespecífico admitindo *P. foliolosa* como sinonímia para *P. reticulata* (WARWICK e LEWIS, 2003). Essa espécie é nativa da América do Sul, mas ocorre principalmente no Brasil, distribuída na Mata Atlântica e Cerrado (LEMOS-FILHO et al., 2008). Pode chegar a 40 m de altura e até 1,5 m de diâmetro a altura do peito (observação pessoal), é polinizada principalmente por abelhas generalistas e a dispersão de sementes é realizada pelo vento (GOULART et al. 2005). Devido à alta qualidade de sua madeira e seu potencial para a regeneração de áreas degradadas é considerada uma importante espécie arbórea (LACERDA et al., 2002). Tem sido atualmente, uma das espécies mais suprimidas da Mata Atlântica do sul da Bahia para fins madeireiros, um dos motivos pelos quais se encontra hoje na categoria de vulnerável à extinção (IUCN, 2011).

O desmatamento provoca a fragmentação florestal, podendo transformar áreas contínuas em um grande número de pequenas manchas de vegetação isoladas umas das outras. Em primeira instância, normalmente há uma redução no número de indivíduos, incluindo os reprodutivos da população, com consequente perda de alelos. Ocorre ainda, uma alteração no fluxo gênico entre e dentro das populações, tornando-as mais suscetíveis aos processos de seleção, deriva genética e endogamia, reduzindo a diversidade genética e acelerando o processo de extinção de espécies (YOUNG et al, 1996; FRANKHAM, 2005). Esses fragmentos sozinhos e isolados são insuficientes para garantir a continuidade das espécies por longo prazo. Existindo assim, a necessidade de se manejar estes fragmentos e as paisagens em que estão inseridos. Neste contexto, o uso de sistemas agroflorestais parece possibilitar a conexão de fragmentos florestais, de modo que torna-se um recurso viável para restabelecer o fluxo gênico e expandir populações de espécies vegetais nativas da Mata Atlântica (TARAZI et al., 2009).

No sul da Bahia, as *cabruças* – sistemas agroflorestais onde se planta o cacau sob a sombra da floresta raleada – possuem importância estratégica para a conservação da biodiversidade na região. A Mata Atlântica do sul da Bahia conserva um dos mais elevados níveis de espécies arbóreas do Brasil e do Mundo (MARTINI et al., 2007), acredita-se que as cabruças possuem importante papel de atuarem como corredores biológicos, facilitando a conectividade entre os fragmentos florestais e o fluxo gênico entre as populações (PARDINI

et al. 2009). A manutenção desta matriz na paisagem é de extrema importância, uma vez que quase 80% dos fragmentos da Mata Atlântica apresentam menos de 50 ha e apenas 9% dos remanescentes florestais estão em unidades de conservação (RIBEIRO et al., 2009).

Contudo, no passado, a Mata Atlântica sofreu um forte impacto relacionado à implantação e expansão do sistema agroflorestal cabruca. Entre outras, a prática de remoção das árvores deixando somente aquelas que podem prover sombra para o cacaueteiro “cabrucagem”, confere a essa região um histórico de forte desflorestamento (SAMBUICHI, 2002). Além disso, a exploração madeireira para fins comerciais que ocorreu no sul da Bahia nos últimos 30 anos chegou a ser considerada a mais expressiva ocorrida ao longo de quatro séculos no Brasil. Todos esses momentos de devastação impressos na história da Mata Atlântica do sul da Bahia despertam o interesse de pesquisadores em verificar o papel desse sistema agroflorestal para as espécies nativas (FARIA e BAUMGARTEN, 2007; SAMBUICHI e HARIDASAN 2007; SAMBUICHI et al., 2008; PARDINI et al., 2009;).

A manutenção da diversidade genética é um dos principais focos da genética da conservação, pois é ela que permite o potencial adaptativo e evolutivo de uma espécie. Por esse motivo, o conhecimento da composição genética de uma espécie, e de como ela está estruturada em suas populações, é fundamental para as ações de manejo e conservação (FRANKHAM et al., 2008; TRAILL et al., 2010). Em populações com diferentes níveis de influência humana, uma comparação entre a estrutura genética espacial (EGE) pode fornecer informações novas e interessantes, relacionadas aos efeitos de longo prazo dos sistemas agroflorestais na genética de populações de espécies arbóreas (KYNDT et al. 2009).

Nas últimas décadas, houve uma ampliação considerável das ferramentas da genética molecular e da sua aplicabilidade na genética da conservação. Dentre elas, o uso dos marcadores moleculares tem um grande destaque por permitir quantificar os impactos da exploração humana em populações de espécies arbóreas. Em meio a estes, os marcadores microssatélites (SSR) são uns dos mais utilizados para esse tipo de estudo. Altamente polimórficos e informativos, os SSR apresentam herança codominante, são multialélicos e baseados na reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*). A taxa de mutação dos microssatélites é suficientemente alta para detectar variabilidade mesmo em situações de parentesco. Ao mesmo tempo é baixa para que uma forte estabilidade seja mantida de geração para geração e, com isso, permitir a definição de perfis genéticos informativos e estáveis para a discriminação de indivíduos, demonstrando variações intra e inter populacionais (EGITO et al., 2004; MENEZES et al., 2006).

Nesse contexto, o presente estudo teve como principal objetivo analisar a diversidade genética, fluxo gênico histórico e estrutura genética espacial de vinhático (*P. reticulata*) em cabucas e unidades de conservação (UCs) do sul da Bahia, visando subsidiar políticas públicas para a restauração da conectividade entre fragmentos, sem prejudicar o potencial evolutivo, ou alterar padrões históricos de colonização da espécie.

Para tal, foram propostos os seguintes objetivos específicos: i) Desenvolver e validar, locos microssatélites nucleares (SSR) polimórficos e específicos para *P. reticulata*; ii) Quantificar os níveis de variabilidade genética em quatro populações de vinhático do sul da Bahia, duas de UCs e duas de cabucas; iii) Estimar o fluxo gênico histórico, estrutura genética espacial entre e dentro de populações através da análise de coancestria de indivíduos adultos de *P. reticulata*, obtendo assim, um retrato histórico da distribuição de genes; iv) Estimar o tamanho efetivo populacional e a área mínima viável para conservação; v) Recomendar com base nas estimativas de coancestria a distância mínima de coleta de sementes entre árvores matrizes, assim como a maneira de distribuí-las em programas de restauração, a fim de manter o potencial evolutivo da espécie e sua forma histórica de colonização (fluxo gênico histórico).

O estudo teve como base a seguinte hipótese: a cabrucagem promove a perda de alelos e genótipos afetando os padrões naturais de distribuição genética espacial dentro das populações de *P. reticulata*.

---

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1. A espécie *Plathymenia reticulata*

*Plathymenia reticulata* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae) é uma espécie arbórea típica de dossel, diplóide ( $2n = 26$ ) (MOORE, 1977), popularmente conhecida como “vinhático”, termo proposto devido a cor do tronco da árvore que alude ao “vinho-tinto” (SILVA JR., 2005). É uma árvore decídua, com flores hermafroditas, polinizada especialmente por abelhas generalistas e vespas, com dispersão de sementes principalmente anemocórica (GOULART et al. 2005), ocorrendo de forma irregular e descontínua, provocando densidades moderadas em determinadas áreas e ausência em outras (LORENZI, 2000). A copa é irregular, aberta, mais ou menos arredondada, pouco densa e com ramificação dicotômica (Figura 1).

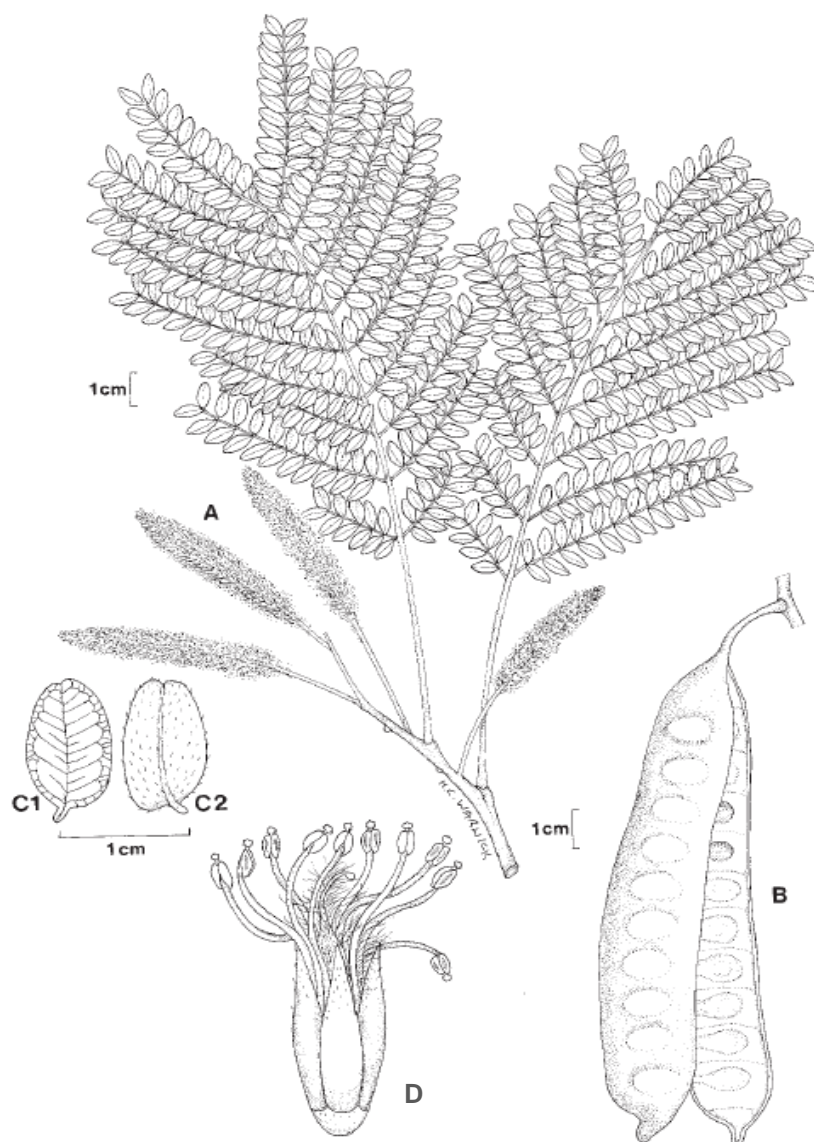


**Figura 1.** *Plathymenia reticulata*. a) árvore adulta presente na área de cabruca da fazenda Vencedora, município de Coaraci, Bahia; b) tronco descamante de uma árvore adulta de vinhático. (Foto: A autora).

As folhas de *P. reticulata* são alternas, bipinadas, medindo de 8 a 28 cm de comprimento; pecíolo variando entre 1,6 a 8,5 cm; com 3 a 12 pares de pinas por folha, paripinada, alternas ou opostas; folíolos em número de 6 a 20 pares por pina, alterno ou oposto, linear a elípticos, membranáceos, emarginados, desde glabros a ligeiramente pilosos, medindo de 4 mm a 17 mm de comprimento por 2 mm a 10,5 mm de largura com o ápice arredondado. As flores são hermafroditas ou bissexuais, medindo de 5 a 10 mm de comprimento, numerosas, descritas como esbranquiçadas, variando em tons de creme a

amarelo esverdeado, com aroma doce semelhante à flor de Citrus, com cinco pétalas diminutas brancas e muitos estames. O fruto é um criptolomento que mede de 7,8 a 16 cm de comprimento por 1,4 cm a 3,6 cm de largura, glabro, oblongo, chato, liso, nítido, pontudo, com estipe de 2 cm a 3 cm, verdes quando imaturos e castanho na maturidade, com 6 a 14 sementes por vagem, ovais a quase circular; o endocarpo fino subcórneo e citrino separa-se do resto e reveste as sementes (Figura 2).

Uma descrição botânica completa de *P. reticulata* pode ser revista em Warwick e Lewis (2003) e Carvalho (2009).



**Figura 2.** *Plathyminia reticulata*. A) Folha; B) Fruto tipo vagem; C1) Face superior do folíolo; C2) Face inferior do folíolo; D) Flor madura (adaptado de WARWICK e LEWIS, 2003).



Trata-se de uma arbórea nativa da América do Sul, que ocorre principalmente no Brasil, distribuída nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Amapá, além da região amazônica. Está distribuída também em outros países como Bolívia, Suriname e norte do Paraguai (WARWICK e LEWIS, 2003).

O gênero *Plathymenia* derivado do grego, *platy* = plano e *hymen* = membrana, referindo-se a membrana no qual a semente é envolvida (CARVALHO, 2009), foi descrito pela primeira vez por George Benthams, em 1842, que organizou o gênero em duas espécies: *P. reticulata* e *P. foliolosa*. Ducke em 1925 fundiu as duas espécies descritas por Benthams, considerando o gênero monoespecífico e *P. reticulata* como a única espécie, muito variável e de ampla dispersão em ambientes diversos (WARWICK e LEWIS, 2003).

Apesar disso, durante décadas, estudiosos se referiram ao gênero considerando ainda duas espécies: *P. foliolosa* Benth., conhecida como “vinhático da mata”, e *P. reticulata* Benth., conhecida como “vinhático do campo” (LACERDA, 2002). Por causa, principalmente, do aspecto das árvores quando estas estão inseridas em habitats distintos. As árvores encontradas em remanescentes de Mata Atlântica são normalmente mais altas, quando comparadas com espécimes que ocorrem no Cerrado brasileiro. Porém, a revisão taxonômica mais recente do gênero *Plathymenia* realizada por Warwick e Lewis (2003), através da análise das características utilizadas para distingui-las como tamanho, indumento, inflorescência e o número de pinas por folha e folhetos por pavilhão, infere que não há nenhuma correlação entre a morfologia e geografia das espécies. Desta forma, a conclusão é que *Plathymenia reticulata* é a única espécie válida, corroborando a proposta de Ducke (1925) e baseada em indícios de dados da sistemática molecular do gênero relatados por Lacerda et al. (2002).

As árvores encontradas em remanescentes de Mata Atlântica e Cabucas, geralmente se encontram em terrenos elevados, mais ou menos secos, principalmente no interior da mata primária densa. A literatura relata que podem atingir alturas de 15 a 30 metros de altura e seus troncos ásperos e descamantes de mais de 70 cm de diâmetro. Entretanto, através de observações pessoais, foi possível encontrar na Mata Atlântica do sul da Bahia árvores de vinhático com até 40 metros de altura e 1,5 m de diâmetro a altura do peito (medido a 1,30 m do solo), na idade adulta. Enquanto que as árvores que ocorrem no Cerrado brasileiro são mais curtas, com altura variando entre 6-12 m e 30 a 50 cm de diâmetro de tronco (LORENZI, 2000). Essa diferença observada na altura das árvores de acordo com o hábitat

em que estão inseridas é, segundo Warwick e Lewis (2003), atribuída aos melhores solos e maior pluviosidade ocorrentes em sítios florestais.

Trata-se de uma importante espécie madeireira, utilizada pelo homem para os mais diversos fins, como na fabricação de folhas faqueadas para revestimentos decorativos, de móveis, painéis, portas nobres; é usada também em construções (navais e civis); em acabamentos internos (esquadrias, rodapés, molduras, persianas e venezianas);, em tonéis de vinho, em artefatos artísticos e em marcenaria de luxo. Na Bahia, essa espécie já foi usada na fabricação de canoas (CARVALHO, 2009).

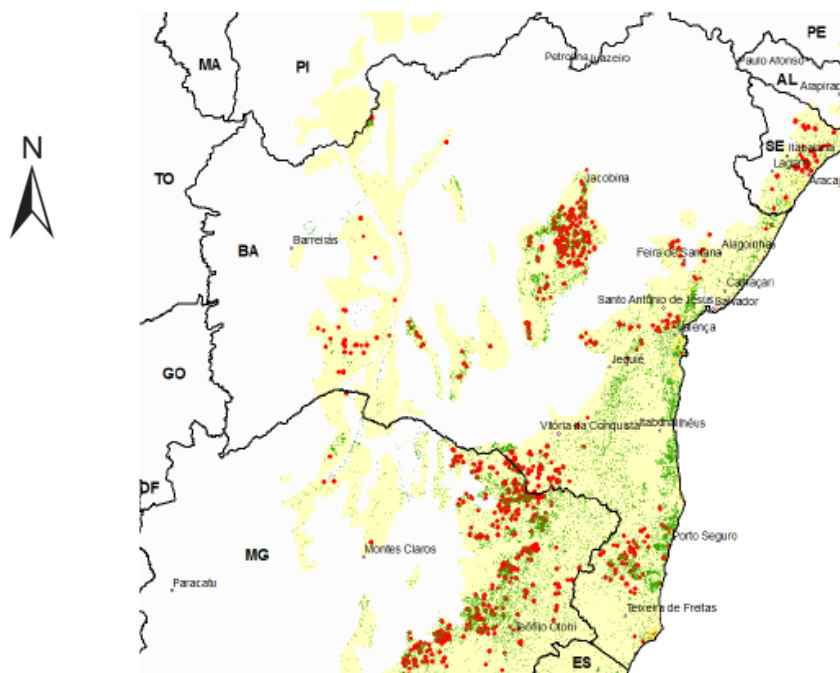
A árvore é bastante ornamental e empregada em paisagismo (LORENZI, 2000), é também utilizada na recuperação de áreas degradadas (POTT e POTT 1997; LORENZI, 2000), na medicina popular, as folhas e a goma são usadas no combate a doenças pulmonares e dermatites; a casca é usada no tratamento de varizes e de edema testicular, no combate à hemorragia e à diarreia (POTT e POTT 1997; SILVA JR., 2005; CARVALHO, 2009). Há ainda, registros relacionando as características químicas de *P. reticulata* com atividade antiinflamatória e antimicrobiana (FERNANDES et al., 2005). Por suas diversas utilidades, a EMBRAPA classificou *P. reticulata* como uma das espécies mais úteis do cerrado brasileiro (ALMEIDA et al., 1998).

Nos últimos anos, diversos estudos com *P. reticulata* foram desenvolvidos relacionados a diversos objetivos como: i) auxílio taxonômico da espécie através de marcador molecular (LACERDA et al., 2002), ii) fenologia (GOULART et al., 2005), iii) morfologia e germinação de sementes (BRAGA et al., 2007), iv) ecofisiologia evolutiva (LEMOS-FILHO et al., 2008), v) filogeografia (NOVAES et al., 2010), entre outros. Porém, somente Lacerda et al. (2001) realizaram, até o momento, um estudo genético-populacional da espécie, utilizando marcadores moleculares RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*). Esse é um marcador amplamente utilizado em estudos populacionais devido à facilidade e rapidez para obtenção dos dados além da universalização das análises. Porém, características como baixa reprodutibilidade das bandas e herança dominante do marcador são as maiores limitações relacionadas ao seu uso. Atualmente, os marcadores microssatélites são considerados uma das ferramentas mais práticas e eficientes disponíveis para estimar parâmetros populacionais. Por essa razão, essa ferramenta foi utilizada neste estudo.

## 2.2. A Mata Atlântica no sul da Bahia

O domínio fitogeográfico Mata Atlântica é considerado *hotspot* de biodiversidade e uma das áreas prioritárias para conservação da biodiversidade no mundo (MITTERMEIER et al., 2005). Está distribuída ao longo da costa atlântica do Brasil, atingindo áreas da Argentina e do Paraguai nas regiões sudeste e sul. Essa floresta cobria originalmente 17,4% (1.3953.849 km<sup>2</sup>) do território nacional, mas atualmente encontra-se altamente fragmentada com menos de 12% (163.775 km<sup>2</sup>) de sua área original. Quase 80% dos fragmentos florestais apresentam menos de 50 ha e apenas 9% dos remanescentes florestais estão em unidades de conservação (RIBEIRO et al., 2009).

Ainda assim, os desflorestamentos continuam (Figura 3), o estado da Bahia ocupa atualmente o segundo lugar no ranking nacional de desmatamento, apesar de nos últimos anos já ter evidenciado uma redução equivalente a 52% na taxa anual média de desmatamento (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2011).



**Figura 3.** Mapa dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no estado da Bahia, Brasil. A área em verde representa a cobertura florestal no ano de 2010. Em amarelo, áreas onde existia Mata Atlântica e os pontos em vermelho representam os desmatamentos no período de 2008 a 2010. (Fonte: Fundação SOS Mata Atlântica, 2011).

A Mata Atlântica tem enfrentado uma longa história de uso intensivo da terra e dos recursos naturais, passando por diversas fases de desmatamento associados diretamente à economia nacional. Desde a chegada dos portugueses no início do século XVI, com a

devastação iniciada por meio da extração do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), passando pela criação de áreas para a monocultura de cana-de-açúcar, que representaram degradação visível à floresta costeira do nordeste, e posteriormente de café, cacau, e chegando a queimadas associadas à criação de pasto para pecuária (TABARELLI et al., 2006).

Na Bahia, as plantações de cana de açúcar surgiram nas primeiras décadas do século XVI nos arredores das cidades portuárias de Ilhéus e Porto Seguro (SAMBUICHI, 2003). Grande parte da floresta remanescente naquela época foi substituída pela lavoura de cana-de-açúcar, tornando os fragmentos florestais ainda menores e isolados. Após a sua decadência, novos ciclos econômicos, de desenvolvimento e de integração nacional surgiram e instalou-se de vez um processo de urbanização, com as principais cidades e metrópoles brasileiras assentadas hoje na área originalmente de domínio da Mata Atlântica, que fizeram com que sua vegetação natural fosse reduzida de forma drástica (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2009).

Entretanto, nesse cenário impactado, ainda há relictos do que esse bioma representa em termos de biodiversidade. A Mata Atlântica é caracterizada por apresentar uma biota única, incluindo diversas espécies endêmicas (SAATCHI et al. 2001; SILVA e CASTELLETTI, 2003; AMORIM, 2009; ), sendo que se encontra no sul da Bahia os mais elevados níveis de diversidade e endemismo já registrados (AMORIM et al., 2008), incluindo uma das maiores diversidades de espécies arbóreas do mundo (MARTINI et al., 2007). Isso é atribuído, sobretudo a sua paisagem composta pelas cabruças, fragmentos florestais e outras formas de uso da terra (SAMBUICHI e HARIDASAN, 2007) funcionando como corredores ecológicos que contribuem para a conservação dessa diversidade (EGGERS et al., 2010).

### **2.2.1. Sistema agroflorestal “Cabruca”**

As cabruças são sistemas agroflorestais onde se planta o cacau (*Theobroma cacao*) sombreado em consórcio com espécies vegetais nativas da Mata Atlântica (Figura 4). A palavra cabruca está relacionada com o verbo *brocar*, que nesse contexto significa roçar a mata, isso porque é típico desse sistema o corte de árvores e arbustos para plantar o cacau (LOBÃO et al., 2007), prática conhecida como “cabrucagem”. Assim, observa-se a substituição de 100% dos elementos do sub-bosque e a remoção de cerca de 90% das árvores por uma cultura de interesse econômico. Esse tipo de sistema implantado sob a proteção das árvores remanescentes para sombreamento da cultura cacauífera mantém grande parte das

espécies arbóreas madeireiras, circundadas por vegetação natural, de grande importância ambiental (SAMBUICHI, 2002).



**Figura 4.** Fisionomia de uma cabruca localizada na Fazenda Jaci, município de Arataca, Bahia. (Fonte: A autora).

As cabrucas apresentam área de cobertura vegetal considerável quando comparada com a ínfima quantidade de remanescentes florestais. Nas fazendas, os pequenos fragmentos conservados são como ilhas em um mar de áreas cultivadas (SAMBUICHI, 2003). Isso pode ser melhor compreendido através dos resultados surpreendentes de Sambuichi e Haridasan (2007) para o sul da Bahia. Em apenas três ha de cabruca, esses autores encontram um total de 2514 plantas divididas em 293 espécies e 52 famílias nativas da Mata Atlântica. A riqueza em biodiversidade é tão significativa que, em uma paisagem florestal altamente fragmentada e em sua maioria inexistente, considerada impactada e insuficiente para garantir a continuidade das espécies endêmicas, as cabrucas, em torno desse mosaico de paisagem, demonstram grande potencial de diminuir o impacto do efeito de borda sobre os fragmentos e de serem conectores genéticos – “corredores ecológicos” – entre populações (FARIA e BAUMGARTEN 2007; PARDINI 2004, 2009).

### **2.2.2. Cabrucas - abordagem histórica**

O cultivo do cacau no Brasil começou em 1679, através da Carta Régia que autorizava os colonizadores a plantá-lo em suas terras. Somente em 1746, o cacauzeiro foi introduzido na Bahia, no atual município de Canavieiras, com sementes provenientes do Pará (GRAMACHO et al. 1992). Contudo, apenas em 1780, quando foi introduzido no município de Ilhéus, o

cultivo foi oficialmente iniciado, principalmente em um sistema de agricultura familiar, onde apenas pequenas áreas na floresta eram abertas para as “roças”. Somente a partir da segunda década do século XIX é que a cultura se firmou na região. Assim, nos anos seguintes, a demanda de cacau no mercado internacional só fez aumentar, iniciando-se um amplo processo de desbravamento da floresta para a expansão da cacauicultura (SAMBUICHI, 2003).

A lavoura que inicialmente ocupava apenas as áreas de solos mais férteis, após os sucessivos ciclos de expansão, passou a ocupar também áreas de solos menos férteis, inclusive solos de tabuleiros. Era a época dos “coronéis do cacau”, que ampliavam as suas fazendas e promoviam o desbravamento da floresta para aumentar suas áreas de cultivo. Contudo, ainda eram mantidas muitas áreas de floresta nativa entre as plantações, uma vez que a madeira era considerada de interesse econômico. Funcionava como uma poupança para uso imediato e futuro (ALGER e CALDAS 1996).

Porém, somente a partir da década de 1960, quando a CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) órgão do Ministério da Agricultura responsável por cumprir as políticas públicas do cacau, foi instituída, é que grandes mudanças aconteceram. Visando aumentar a produtividade e a lucratividade da cultura por meio do aumento da luminosidade direta nas copas dos cacaueiros, estimulou os cacauicultores à simplificação do ecossistema com, pelo menos, duas propostas: a diminuição de 50% a 70% na densidade de árvores para sombreamento, o que significava a eliminação de cerca 25,8 milhões de árvores nativas na região (JOHNS, 1999), e a transformação em monocultura com o corte raso e plantio de uma única espécie na proteção de topo do cacaueiro, a exótica *Erythrina fusca*, numa densidade bem mais baixa que a praticada (LOBÃO, 2007).

Todas essas práticas proporcionaram um aumento temporário na produção de cacau. Pois no final da década de 1980, uma forte crise se abateu sobre a lavoura, devido aos baixos preços do produto no mercado internacional e pela doença conhecida como vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* que dizimou as plantações de cacau na região (ALGER e CALDAS, 1996). Assim, o sul da Bahia que até o início da década de 1970, permaneceu como uma das regiões mais florestadas da Mata Atlântica iniciou um histórico de exploração madeireira intensiva e predatória, pois a exploração que até então era local, seletiva e de baixa intensidade, passou a ser realizada pelos produtores endividados para a venda de madeira, implantação de pastagens ou diversificação de culturas (ALGER e CALDAS, 1996). Calcula-se que cerca de um bilhão de árvores foram derrubadas nessa região entre os anos de 1985 e 1990 (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 1993).

A exploração madeireira que ocorreu no sul da Bahia nos últimos 30 anos chegou a ser considerada a mais expressiva ocorrida ao longo de quatro séculos no Brasil (CUNHA, 2006). Outro fator que contribuiu para a intensidade da devastação foi a abertura da BR 101, facilitando o acesso à capital do estado e o avanço das madeireiras sobre a floresta. Segundo Lobão (2007) os meios de comunicação da época informavam que a velocidade de destruição passava dos 100 ha ao dia. O fato é que a Mata Atlântica do sul da Bahia foi destruída em menos de 30 anos, e os danos causados não foram revertidos e as ameaças continuam.

### **2.3. Consequências genéticas do corte em espécies arbóreas**

O corte clandestino ainda acontece com frequência nos remanescentes florestais da região sul da Bahia (SAMBUICHI et al., 2009), apesar das proibições ao desmatamento e à comercialização de madeira nativa deste bioma (Lei Federal 11.428 de 22/12/2006). A Bahia ainda ocupa o segundo lugar no ranking nacional de desmatamento (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2011).

Embora a fragmentação de hábitat e exploração, tais como a cabrucagem, sejam comuns em florestas tropicais, ainda não são totalmente compreendidos os efeitos da exploração seletiva de madeira sobre a variabilidade e estrutura genética das populações (CONTE et al., 2006).

Sabe-se, entretanto que, além das consequências ecológicas geradas pelo desmatamento, há consequências genéticas que contribuem para o risco de extinção de populações e espécies. De acordo com a intensidade de exploração, tais alterações podem resultar em efeitos negativos sobre a estrutura genética de populações, tais como perda de alelos raros, aumento da endogamia, redução da aptidão, *fitness*, das gerações seguintes, e alteração dos padrões de distribuição espacial dos indivíduos dentro das populações (ALLENDORF e LUIKART, 2007).

Uma forte redução no tamanho da população pode, ainda, levar à deriva genética aleatória, o que pode resultar na fixação de alelos, aumento na relação de parentesco entre os indivíduos e, conseqüentemente, à perda de diversidade genética (ELLSTRAND e ELAM, 1993; REED, 2005). Em geral, essas consequências são mais extremas nos indivíduos mais jovens de populações remanescentes. Contudo, quando os indivíduos adultos são retirados, a produção de sementes é afetada, comprometendo a manutenção das espécies na região

(SAMBUICHI et al., 2009). Com isso, diversas espécies estão em risco de extinção devido à redução do número de indivíduos e destruição de hábitat (VIERA et al., 2009).

Muitos desses efeitos podem não ser detectados de imediato nas análises genéticas populacionais das populações que sofreram o impacto, caso observado por Conte et al. (2006), em estudo comparando os níveis de variabilidade em populações de *Euterpe edulis* exploradas com outras não perturbadas. A esse respeito, os autores sugerem que tais consequências podem vir a se manifestar somente nas próximas gerações, sobretudo nas populações tradicionalmente exploradas, onde o tamanho efetivo da população de indivíduos adultos é consideravelmente reduzida.

Por outro lado, em populações exploradas de *Tabebuia cassinoides*, Sebbenn et al. (2000) observaram perdas de alelos, juntamente com uma redução significativa da heterozigosidade observada e diversidade genética, ainda nas primeiras gerações após a exploração. As perdas de diversidade genética na época da exploração ocorrem mais provavelmente devido à formação de gargalos genéticos e da endogamia ocorrente nas pequenas populações subsequentes (YOUNG et al., 1996).

### **2.3.1. Diversidade Genética e o papel da Genética da Conservação**

Com a necessidade premente da conservação, manejo e recuperação dos fragmentos do que restou da Floresta Tropical Atlântica, o papel da genética na biologia da conservação e na ecologia em geral, tem sido muito enfatizado durante as últimas duas décadas (HEDRICK, 2001; FRANKHAM, 2005). Contribuições importantes para a compreensão dos efeitos da exploração e fragmentação de hábitat que acompanham a erosão genética e o risco de extinção, a dinâmica de adaptação das espécies às novas condições ambientais foram unidas, formando uma nova disciplina científica: a genética da conservação. Esta tem como principal objetivo gerar estudos que atuem como base para a compreensão de processos populacionais e evolutivos relevantes para a conservação e manejo de espécies (YOUNG et al., 1996; OUBORG et al., 2006, 2010).

Para conservação genética de uma espécie é necessário o conhecimento da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de suas populações (LACERDA e KAGEYAMA 2003). A diversidade genética é denominada como a variedade de alelos e genótipos presentes em um determinado grupo, material bruto sobre o qual a seleção natural pode atuar para



permitir a adaptação e evolução dos organismos e sua adequação às mudanças ambientais (FRANKHAM , BALLOU & BRISCOE, 2008).

Para estudos de diversidade genética, os índices mais comumente estimados são, as frequências alélicas, o número de alelos por loco, as heterozigosidades médias observada e esperada e o índice de fixação. Contudo, o poder estatístico desses índices depende fortemente da estrutura real da população, tamanho da amostra, tipo e número de locos utilizados, número de alelos obtidos e modelo mutacional admitido (CAVERS et al. 2005).

A diversidade genética é inserida continuamente nas populações por mutação ou migração de indivíduos de outras populações e é perdida por deriva genética, por endocruzamentos e pela maior parte dos tipos de seleção natural (COLE, 2003). Portanto, é de suma importância determinar o nível esperado da variação genética ocasionada por essas fontes.

A migração insere novos alelos em uma população a partir de outros existentes em populações vizinhas. Já a mutação insere novos alelos em uma população pelo efeito do acaso durante a replicação do DNA (BALLOUX e GOUDER, 2002).

A endogamia ( $F$ ), fonte de modificação das frequências genotípicas, se traduz na probabilidade de aleatoriamente dois alelos serem idênticos por descendência em um mesmo loco de um determinado indivíduo (LYNCH e WALSH, 1998). O principal efeito da endogamia é a diminuição da heterozigosidade da população, quando comparada à heterozigosidade esperada (KAGEYAMA et al., 2003). Essa redução pode levar a perdas de alelos importantes na população. Já, em populações de polinização cruzada, a endogamia pode acarretar no aumento de alelos deletérios recessivos idênticos por descendência, e por consequência, ocorrer a diminuição da fecundidade, aumento da mortalidade de sementes e plântulas, redução da taxa de crescimento dos indivíduos, eventualmente conduzindo as populações à extinção (YOUNG et al., 1996; REED, 2005; FRANKHAM, 2005). Para medir esse parâmetro é necessário dispor do pedigree da população, porém como nem sempre é possível conhecer esses dados, a maneira mais comum de estimá-la é através do índice de fixação ( $F$ ) de Wright (1951). Este estima os desvios das frequências genotípicas causadas na população em estudo, comparadas a uma população sob panmixia.

Quando as populações se tornam pequenas, é possível o aumento das taxas de endogamia e maiores efeitos da deriva genética, podendo levar a uma redução da variabilidade genética e a perda de alelos importantes (COLE, 2003). A deriva genética

refere-se às oscilações não direcionais nas frequências alélicas de uma população, levando eventualmente a fixação ou a perda do alelo, de maneira que o tamanho de uma amostra em particular pode não ser mais representativo da sua população de origem (HARTL e CLARK, 2010). Independentemente da forma como ocorre a deriva genética, a sua principal consequência é a redução do tamanho efetivo populacional (YEH, 2000).

Do ponto de vista da Genética de Populações, a erosão genética e as medidas de combate para minimizar seus efeitos, podem ser enfocadas sob a ótica do tamanho efetivo populacional. Esse conceito, introduzido por Sewall Wright, há cerca de 80 anos, relaciona-se intimamente com a questão da representatividade genética da amostra (VENCOVSKY, 1987). O tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) é definido como o tamanho de uma população idealizada cuja composição genética é influenciada por fatores estocásticos, da mesma maneira que uma população real de tamanho  $N$  (WRIGHT, 1931). Em outras palavras,  $N_e$  é o tamanho de uma população idealizada que perderia diversidade genética (ou se tornaria endogâmica) na mesma proporção da população atual.

O conhecimento do  $N_e$  é importante em programas de conservação *in situ* e *ex situ* que visam manter em longo prazo a viabilidade evolutiva das espécies, além de auxiliar no manejo sustentável e melhoramento genético. Este está relacionado a fatores como o tamanho amostral, modo e sistema de reprodução, o número de genitores, o desvio da razão sexual de 1:1, as variações no sucesso reprodutivo, sobreposição de gerações, presença de estrutura genética e endogamia. Em uma população com estrutura familiar este parâmetro é influenciado pelo índice de fixação ( $F$ ) e pelo coeficiente de coancestria ( $\theta$ ) (VENCOVSKY e CROSSA, 2003).

## 2.4. Fluxo Gênico

O fluxo gênico é definido como o movimento de genes em populações, incluindo dessa forma, todos os movimentos de gametas, propágulos e indivíduos que efetivamente trocam genes em sua distribuição espacial (NEIGEL, 1997). Levin e Kerster (1974)<sup>1</sup> *apud* Borém (2001) definem fluxo gênico como o movimento da informação genética entre indivíduos, populações ou espécies. Em plantas, no sentido amplo, o fluxo gênico pode se estabelecer pelo movimento de pólen ou sementes. Assim o fluxo gênico pode ser

---

<sup>1</sup> LEVIN, D.A.; KERTER, H.W. (1974) **Gene flow in seed plants**. *Evolutionary Biology* 7:139-220.

considerado como uma medida da fertilização ou estabelecimento de indivíduos férteis, em razão da distância percorrida da fonte até o local onde a dispersão ocorreu.

Futuyma (2002) menciona que o grau no qual uma população pode ser delimitada de outras depende do nível de fluxo gênico entre elas. Dessa forma, apresenta quatro modelos básicos de fluxo gênico que correspondem a diferenças na estrutura de populações:

- a) modelo continente-ilha, em que o movimento dos genes é unidirecional, partindo de uma população maior para outra menor e isolada ou, para colonização;
- b) modelo de ilhas, onde a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações bem definidas;
- c) modelo de alondras ou *stepping-stone*, onde as populações trocam migrantes apenas entre populações vizinhas e;
- d) modelo de isolamento por distância, no qual o fluxo ocorre localmente entre grupos vizinhos, em uma população de distribuição contínua.

#### **2.4.1 Estimativas do fluxo gênico**

O fluxo gênico pode ser mensurado de forma direta ou indireta. 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. Uma diferença importante entre as duas abordagens é que, em geral, os métodos diretos mensuram toda a dispersão, ao passo que os métodos indiretos mensuram somente a dispersão efetiva (BROQUET e PETIT, 2009).

O método direto pode ser mensurado através da observação da dispersão dos grãos de pólen ou das sementes, o que permite a estimativa do fluxo gênico potencial ou da dispersão gênica. Outros métodos diretos utilizam marcadores genéticos para acompanhar os movimentos contemporâneos de indivíduos ou de propágulos e reconstruir as relações de parentesco, como na paternidade e / ou análises de parentesco (JONES e ARDREN 2003), e, nesse caso, pode-se estimar o fluxo gênico real.

Stewart et al. (2003) sugerem a utilização de marcadores moleculares como auxílio a estudos de fluxo gênico, por serem neutros (seu padrão de polimorfismo independe do ambiente) e de número ilimitado. Um dos métodos diretos mais utilizados, trata do uso de marcadores moleculares para análise de paternidade (DOW e ASHLEY, 1998). A análise de paternidade consiste na utilização de locos gênicos para identificar o genitor mais provável de

um conjunto de candidatos. Uma vez que o genitor é identificado, o padrão do movimento do pólen pode ser determinado na população. Se o marcador molecular é altamente polimórfico, como no caso dos microssatélites, e o número de genitores potenciais é relativamente pequeno, o genitor de cada semente pode ser identificado de forma precisa (BORÉM, 2001). No entanto, a limitação geral dos métodos diretos é que somente podem ser aplicados a populações pequenas (ZUCCHI, 2002).

Os métodos indiretos utilizam os dados do pool gênico, da distribuição da variância genética para inferir a intensidade de fluxo gênico (SMOUSE e SORK 2004). Medem o fluxo gênico médio, ao refletirem os efeitos acumulativos da variação temporal na distribuição espacial da dispersão e do estabelecimento ocorridos ao longo dos anos (SLATKIN, 1985). A maioria das abordagens indiretas estima os parâmetros de dispersão histórica através da estrutura genética observada ( $F_{ST}$ ), chamado assim fluxo gênico aparente, pois este método admite a estrutura genética populacional sob modelo de ilhas de Wright (1951), assumindo equilíbrio entre migração-deriva (HARDY et al., 2006).

Para o modelo de ilha, Wright (1965) propôs a famosa relação  $F_{ST} = 1 / (1 + 4Nm)$ , ilustrando que a diferenciação genética entre populações ( $F_{ST}$ ) depende de um equilíbrio entre deriva genética local ( $N$ , tamanho efetivo populacional) e dispersão ( $m$ , a taxa de migrantes por geração). O  $F_{ST}$  é uma função efetiva do número de migrante por geração.

Uma grande vantagem dos métodos indiretos é que eles são relativamente fáceis de aplicar em populações naturais. Não requerem amostragem exaustiva da população e são menos exigentes em termos de polimorfismo do marcador (HARDY et al. 2006). Embora não forneçam informações detalhadas como as análises de paternidade e apresentem outras potenciais limitações, Hardy et al. (2006) sugerem que análises de estrutura genética espacial em fina escala podem fornecer estimativas confiáveis das distâncias de dispersão de genes histórica em espécies arbóreas tropicais.

Estimativas de fluxo gênico tanto do pólen como de sementes são necessários para avaliar o impacto, sobre a estrutura genética de uma espécie arbórea, da perturbação humana em habitat anteriormente estável (AGUILAR et al., 2008). Em seguida, uma maior atenção é dada a abordagem do fluxo gênico histórico, estrutura genética espacial, e sua aplicação em espécies arbóreas tropicais.

## 2.5. Estrutura genética espacial

O padrão espacial ou a estrutura da diversidade genética de populações é um componente importante dos processos genético-ecológicos e evolutivos de populações naturais de plantas. A estrutura genética espacial (EGE) em populações naturais trata da distribuição não aleatória dos alelos e genótipos no espaço. Tal estrutura pode ser determinada pelo fluxo gênico, mediado através da dispersão de pólen e sementes, pode também ser o resultado de pressão de seleção e eventos históricos de colonização (LOISELLE et al., 1995, VEKEMANS e HARDY, 2004, DICK et al., 2008). Segundo HARDY et al. (2006), a dispersão das espécies é um fator determinante da dinâmica de populações, comunidades e ecossistemas, podendo uma dispersão limitada de sementes, indiretamente influenciar a dispersão de pólen, o que por sua vez favorece a agregação de árvores em estrutura de famílias.

Espécies arbóreas muitas vezes apresentam populações estruturadas, devido os seus mecanismos primários de dispersão de sementes, que geralmente ocorrem próximas ou na vizinhança das árvores matrizes (VEKEMANS e HARDY, 2004). Como consequência, pode haver endogamia e parentesco nas populações (SEBBENN e SEOANE, 2005). Quando indivíduos se encontram espacialmente próximos, sendo mais correlacionados entre si do que indivíduos distantes, sobretudo em populações de tamanho reduzido, pode ocorrer o aumento de cruzamentos entre indivíduos aparentados e endogamia biparental na descendência (BITTENCOURT e SEBBENN, 2008).

A endogamia em uma geração é igual ao coeficiente de coancestria da geração precedente, de forma que, se indivíduos próximos são parentes e cruzam entre si, será gerada endogamia biparental na descendência igual à coancestria existente entre os parentais cruzados (LINDGREN et al., 1996). Esse tipo de endogamia, por sua vez, pode desencadear a depressão endogâmica. Apresentando os efeitos negativos observados para endogamia advinda de autofecundação, como perda de vigor, adaptação e fertilidade, além de redução na taxa de crescimento, má formação, maior taxa de mortalidade, etc. Por isso, o conhecimento da distribuição espacial da variabilidade genética dentro de populações naturais de plantas, pode melhorar a eficiência da amostragem, maximizando a diversidade genética e/ou minimizando os cruzamentos endogâmicos (EPPERSON, 1990).

Para detecção da EGE, comumente são utilizadas as análises de autocorrelação espacial, utilizando o índice  $I$  de Moran, os coeficientes de coancestria ( $\hat{\theta}_{xy}$ ), os coeficientes

de parentesco ( $r_{xy}$ ), os coeficientes de fraternidade ( $\Delta_{xy}$ ), a distância genética entre indivíduos ( $\alpha_{xy}$ ) e as estatísticas  $S_p$  (HARDY; VEKEMANS, 2002; HARDY et al., 2006; VEKEMANS; HARDY, 2004; NAKANISHI et al., 2008). Coancestria, parentesco e endogamia são conceitos intimamente relacionados. De acordo com Sebbenn e Seoane (2005) o que é fato comum entre todos os métodos é a necessidade de grande número de locos e alelos para a obtenção de estimativas confiáveis (baixos erros associados). Não é objetivo aqui descrever cada um desses estimadores, mas uma atenção especial é dada ao coeficiente de coancestria, por ser esse o método escolhido para estimativa da EGE nesse estudo.

A coancestria ( $\theta_{xy}$ ) é a probabilidade de que dois alelos homólogos, retirados aleatoriamente de dois indivíduos,  $x$  e  $y$ , sejam idênticos por descendência, isto é, sejam cópias de um mesmo alelo de um ancestral recente (LYNCH e WALSH, 1998). Em populações de cruzamentos aleatórios, a coancestria equivale à endogamia na descendência. Essa definição de coancestria inclui o caso em que os dois indivíduos são idênticos, quando se obtém a autocoancestria ( $\theta_{xx}$ ), que equivale à endogamia na descendência após autofecundações. Assim, o parentesco de uma geração, quando medido em termos de coancestria, corresponde à endogamia que pode ser gerada na descendência, se os indivíduos forem cruzados.

Segundo Vekemans e Hardy (2004) populações de espécies arbóreas, costumam apresentar estrutura genética espacial. Esta já vem sendo detectada em diversos estudos com espécies arbóreas tropicais (GIUDICE NETO e KAGEYAMA, 2000; LACERDA e KAGEYAMA, 2003; MORAES et al., 2005; MOURA et al., 2009; TARAZI et al., 2009; SEBBENN et al., 2011; DEBOUT et al., 2011). Conhecer a estrutura genética espacial de populações de espécies arbóreas, segundo Bittencourt e Sebbenn (2008) é de fundamental relevância para a conservação de florestas e coleta de sementes para restauração ambiental.

Abordagens através de marcadores genéticos moleculares estão sendo amplamente difundidas, afim de inferir os parâmetros até então mencionados, pois, estes são considerados de fundamental importância para estratégias de conservação de uma espécie, incluindo abordagens tais como o tamanho efetivo populacional, gargalos genéticos, efeito fundador e fluxo gênico histórico e contemporâneo (HEDRICK, 2001). A seguir é realizada uma descrição mais detalhada do marcador microssatélite e características singulares, as quais fizeram dele o marcador apropriado para o presente estudo.

## 2.6. Microssatélites

Os marcadores microssatélites, são também conhecidos como, *Simple Sequence Repeat* (SSR), *Short Tandem Repeat* (STR), *Sequence Tagged Microsatellite* (STMS), *Simple Sequence Length Polymorphism* (SSLP) ou *Sequence-Tagged Sites* (STS) (KUMAR et al., 2009). Foram descritos por três grupos de cientistas como sequências curtas de DNA variando de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* (lado a lado) (LITT e LUTY et al., 1989; TAUTZ, 1989; WEBER et al., 1989). São classificadas pelo motivo repetido, podendo ser mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos (POWELL et al. 1996). Também podem ser descritos pelo tipo de sequência repetitiva, como microssatélites perfeitos, imperfeitos, ou compostos (WEBER, 1990). Os perfeitos são aqueles em que o motivo se repete de forma contínua, sem interrupção de outro motivo ou outra sequência (ex.: CACACACACACACA). Os compostos são aqueles nos quais existe repetição de mais de um tipo de motivo (ex.: CACACACACACAGAGAGAGAGA). Já os imperfeitos aqueles que apresentam outras sequências além daquelas repetidas em *tandem* (ex.: CACACACACATGCTCACACA). Além disso, também podem ser classificados quanto ao número de pares de bases encontrado, podendo ser: Classe I ( $\geq 20$  pb) e Classe II ( $\geq 12$  e  $< 20$ ), conforme Temnykh et al. (2001).

Os microssatélites são amplamente distribuídos pelo genoma da maior parte dos eucariotos e alguns procariotos, podendo estar presentes em regiões codificadoras e não codificadoras (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; ZANE et al., 2002). Nos indivíduos eucariotos pode-se encontrar uma sequência de microssatélites a cada 10.000 pb, aproximadamente. Nos procariotos eles estão em número bem reduzido. Acredita-se que sua presença é mantida por seleção positiva, pois microssatélites longos são, por vezes, associados a fatores de virulência, neste caso, agindo como “interruptores” dos processos de transcrição e tradução (ELLEGREN, 2004).

Em plantas, foram descritos pela primeira vez em espécies arbóreas tropicais por Condit e Hubbell (1991), que detectaram a presença das repetições  $(AC)_n$  e  $(AG)_n$ . Em geral, no genoma de plantas superiores a frequência da repetição  $(AC)_n$  é normalmente menor do que em mamíferos, e o dinucleotídeo  $(AT)_n$  é o motivo mais encontrado, seguido por  $(A)_n$  e  $(AG)_n$  (ELLEGREN, 2004). Morgante e Olivieri (1993) constataram em 34 espécies vegetais a presença de microssatélites, sendo o dinucleotídeo AT o elemento repetido mais comum, também constataram que estes marcadores estão em menor frequência que nos vertebrados, mas em maior frequência que nos invertebrados e fungos. De modo geral, a frequência das diferentes classes de SSRs diminui à medida que aumenta o tamanho do motivo repetitivo.

As regiões de microssatélites são instáveis no genoma, pois estão sob constantes alterações mutacionais, geralmente do tipo adição ou deleção de repetições, em taxas mais elevadas do que nas regiões de DNA não repetitivo (ZUCCHI, 2002), sendo que esta taxa apresenta-se com frequência de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  por loco em cada geração, esse valor é considerado alto, quando comparado a regiões codificantes do genoma, que apresentam taxas de mutação entre  $10^{-9}$  a  $10^{-10}$  (GOLDSTEIN, 1999). Dois mecanismos podem estar envolvidos na origem e expansão dessas “ilhas” de microssatélites. O primeiro envolve os erros ocorridos durante o processo de replicação do DNA, sobretudo aos escorregões (*slippage*) da DNA polimerase que resulta em um imperfeito emparelhamento da cadeia dupla de DNA durante a fase de replicação (ELLEGREN, 2004). O segundo envolve o processo de recombinação do DNA, através do crossing-over desigual, em que são trocados segmentos entre cromossomos homólogos de maneira desigual, resultando em deleções ou expansões (LI et al., 2002; ELLEGREN, 2004). Esses processos permitem a geração de um grande número de locos microssatélites polimórficos e multialélicos.

A origem e evolução dos locos microssatélites ainda não estão completamente esclarecidas. Um profundo entendimento a esse respeito torna-se necessário não somente para a compreensão de como o genoma é organizado, mas também para o uso e interpretação correta dos dados (ELLEGREN, 2004). Alguns modelos mutacionais são adotados quando se analisam locos microssatélites em estudos populacionais, e três modelos são principalmente empregados (OLIVEIRA et al., 2006):

Modelo de alelos infinitos (*Infinite Allele Model* - IAM): neste modelo, cada mutação aleatória cria um alelo novo sempre, pela perda ou ganho de qualquer número de unidades de repetição, diferente de todos já existentes na população. Assumindo este modelo para microssatélites, mutações alteram o número de repetições. A proximidade dos alelos, em relação ao número de repetições, implica em alelos idênticos por ascendência, mas não indica uma maior relação filogenética. Este é o modelo clássico de Wright (1931) em que ele se baseou para o desenvolvimento das estatísticas-*F*.

Modelo passos de mutação (*Step Mutation Model* - SMM): nesse modelo, o novo alelo dependerá do estado alélico anterior, ele é gerado pela mutação através de deleção ou acréscimo de uma única unidade repetitiva (taxa fixa) e admite-se uma simetria no processo, independentemente do tamanho da repetição. Considera-se também a possibilidade de eventuais fenômenos de homoplasia. Isto implica que dois alelos diferentes por um único motivo repetitivo estão mais intimamente relacionados do que alelos que diferem por várias



repetições. Slatkin (1995) propôs uma medida de diferenciação genética ( $R_{ST}$ ) semelhante ao  $F_{ST}$  de Wright (1951) e  $G_{ST}$  de Nei (1973), com base no modelo SMM. Esse modelo é geralmente preferido ao estimar as relações entre indivíduos e estrutura da população, exceto na presença de homoplasia. Isto é, existência de alelos com o mesmo tamanho, mas sequência ligeiramente diferente, logo com uma ancestralidade distinta, assim dois alelos são idênticos por estado, mas não por ascendência (BALLOUX e LUGON-MOULIN, 2002).

Modelo de duas fases (*Two Phase Model* - TPM): Este surgiu como uma extensão do modelo SMM para estudos sobre microssatélites. Esse modelo propõe que diversos eventos mutacionais resultam em um aumento ou diminuição de uma ou mais unidades repetitivas. Embora, ainda que menos frequentes, também ocorram alterações de um grande número de repetições (OLIVEIRA et al., 2006). Neste modelo, a dinâmica evolutiva difere entre locos e principalmente entre espécies (ESTOUP et al., 2002).

Os microssatélites são amplamente utilizados em estudos genéticos, quando comparados a marcadores como RAPD e RFLP, isso devido ao seu alto conteúdo informativo; herança mendeliana; serem codominantes, permitindo a discriminação entre homocigotos e heterocigotos. O alto poder discriminatório deste marcador é uma característica importante que merece destaque, motivo pelo qual é amplamente utilizado em estudos de genética de populações, análises de paternidade e forense (OLIVEIRA et al., 2006).

O uso dos microssatélites se deu graças à reação da polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), que abriu caminho para Beckmann e Soller (1990) desenvolverem a técnica que envolve estes marcadores. Nesta técnica, as regiões contendo sequências simples repetidas são amplificadas individualmente através de PCR, utilizando-se um par de iniciadores (*primers*) específicos (de 20 a 30 bases) complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite, o que faz deles ótimos marcadores moleculares.

Ainda, devido às características de uniloco e ao uso da PCR e de *primers*, a reprodutibilidade dos marcadores microssatélites é alta e a análise não requer alta qualidade do DNA (SCHLÖTTERER, 2004). Nos estudos de conservação genética de populações naturais de espécies arbóreas, o emprego dos SSR contribuiu para a melhoria das estimativas de parâmetros genéticos, especialmente em populações com baixa densidade populacional.

## 2.7. Desenvolvimento de microssatélites

A maior limitação relacionada à utilização dos microssatélites é que iniciadores específicos que flanqueiam as regiões de DNA repetitivo precisam ser isolados a partir de espécies que estão sendo analisadas pela primeira vez. O alto custo e intensiva mão-de-obra, considerando todas as etapas envolvidas no desenvolvimento dos *primers* (construção de biblioteca genômica, seleção de clones positivos, sequenciamento, desenho e teste de *primers*), representam ainda hoje uma das poucas desvantagens no uso desse tipo de marcador (ZANE et al., 2002; BUSO et al., 2003; KUMAR et al., 2009).

Entretanto, uma vez obtidos os *primers* 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. Outro benefício evidenciado, é que em alguns casos, a transferência de marcadores SSR entre espécies do mesmo gênero é possível, devido à homologia de sequências genômicas relacionadas, dependendo da distância taxonômica das espécies e ao grau de conservação das regiões flanqueadoras dos microssatélites. Esta característica proporciona uma otimização no uso da ferramenta, além do aumento no número de dados que podem ser obtidos a partir desses marcadores.

Assim, tem aumentado a quantidade de publicações descrevendo o desenvolvimento de primers para as mais diversas espécies de arbóreas tropicais, tais como eucalipto (BRONDANI et al., 1998), pequi (COLLEVATTI et al., 1999), copaíba (CIAMPI et al., 2000), palmito (GAIOTTO et al., 2001), mogno (LEMES et al., 2002), maçaranduba (AZEVEDO et al., 2005), jequitibá (GUIDUGLI et al., 2009), pau-papel (TELLES, et al., 2011), dentre outras.

Uma série de novos protocolos tem aparecido na literatura nos últimos anos, com objetivo de superar as limitações no isolamento de locos microssatélites, os principais deles são descritos por Zane et al., (2002). Estes métodos geralmente apresentam pequenas diferenças entre si e frequentemente não têm sido extensivamente testados.

Tradicionalmente, o isolamento de locos microssatélites tem sido realizado a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas, onde se utiliza sondas contendo sequências repetitivas que se ligam por hibridização as repetições de interesse de vários milhares de clones de um determinado organismo (RASSMANN et al., 1991). Nesta estratégia, geralmente se faz necessária a triagem de um número elevado de clones para obtenção dos locos. Contudo, de acordo com Zane et al., (2002) o método de biblioteca genômica enriquecida é, ainda assim, o

mais utilizado para isolamento de microssatélites em plantas. Esta foi a estratégia escolhida para o desenvolvimento de SSR usada neste trabalho e será descrita em detalhes no primeiro capítulo.

---

## CAPÍTULO 1

---

### MICROSATELLITE MARKERS FOR *PLATHYMENIA RETICULATA* (LEGUMINOSAE)

Capítulo submetido para revista *American Journal of Botany Primer Notes & Protocols*:

**Microsatellite markers for *Plathymenia reticulata* (Leguminosae)**

Fernanda A. Oliveira<sup>1</sup>; Roberto Tarazi<sup>1</sup>; Ivandilson P. P. Menezes<sup>1</sup>; Cassio Van Den Berg<sup>2</sup>;  
Siu M. Tsai<sup>3</sup>; Fernanda A. Gaiotto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética, Centro de Biotecnologia e Genética (CBG), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC); <sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santa (UEFS); <sup>3</sup>Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo (USP).

## ABSTRACT

- *Premise of the study:* Microsatellite markers were developed and characterized to investigate genetic diversity, gene flow and help in conservation efforts for the endangered timber species *Plathymenia reticulata*.
- *Methods and Results:* Eleven microsatellite loci were characterized using 60 adult trees of two populations of *P. reticulata* from the Atlantic Forest of Southern Bahia, Brazil. From these, nine loci were polymorphic, with an average of 4.39 alleles per locus. The average expected heterozygosity per population ranged from 0.47 to 0.55. The combined exclusion probability was 0.99996.
- *Conclusions:* Our results reveal that the microsatellite markers developed in this study are an effective tool for paternity and genetic structure analysis that may be useful for conservation strategies.

**Key words:** Atlantic Forest; savannah; *Plathymenia reticulata*; Primer; SSR.

## 1. INTRODUCTION

*Plathymenia reticulata* Benth. (Leguminosae) is a diploid ( $2n = 26$ ) (Moore, 1977), hermaphroditic, insect pollinated, wind-dispersed and deciduous Neotropical tree species, with wide distribution in the Brazilian Atlantic Forest and savannah (namely Brazilian Cerrado) (reviewed by Novaes et al., 2011). *Plathymenia* is a monospecific genus after *P. foliolosa* was synonymized under *P. reticulata* (Warwick and Lewis, 2003). Trees of *P. reticulata* found in the Atlantic Forest are usually higher and have a thicker trunk when compared with specimens that occur in Cerrado. Due to *P. reticulata* size in the Atlantic Forest, which can reach a height up to 40 m and a diameter at breast height of 1.5 m (personal observation) and its high quality wood; selective logging and habitat loss has turned it vulnerable to extinction. However, *P. reticulata* has a high potential for regeneration in degraded areas and it has been used to shade the cocoa agroforestry systems in Southern Bahia, Brazil. These facts may aid in the conservation of this species, but little is known about the evolutionary potential of *P. reticulata* populations. Aiming to assist in conservation and management models for Brazilian Atlantic Forest and Cerrado, we describe novel microsatellite markers for *P. reticulata*, which will allow studying the genetic structure, as well as the evolutionary potential of the remaining populations.

## 2. METHODS AND RESULTS

For library construction, an individual of *P. reticulata* was chosen randomly and total genomic DNA was extracted from young leaves using the CTAB method (Doyle and Doyle, 1990). A microsatellite-enriched library was obtained using a protocol adapted from Billotte et al. (1999). The DNA was digested with *RsaI* endonuclease (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). An enriched library was obtained by hybridization with (CT)<sub>8</sub> and (GT)<sub>8</sub> biotinylated probes. Fragments were captured by streptavidin-coated magnetic beads and then PCR-amplified, cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and transformed into competent cells of *Escherichia coli* XL1-Blue (Promega, Madison, Wisconsin, USA) by electroporation method. Positive clones were selected using the  $\beta$ -galactosidase gene. From 156 positive clones included in the library, 96 were amplified and sequenced on an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). The sequencing reactions (10  $\mu$ L) contained 200 ng of plasmid DNA, 1x Save Money buffer (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM Tris-HCl pH 9.0), 5 pmol of primer M13 and Big Dye Terminator mix (version 3.1; Applied Biosystems, Foster City, California, USA). This reaction was done according to the following conditions: initial denaturing at 96°C for 2 min, followed by 26 cycles of 96°C for 45 s, 50°C for 30 s, 60°C for 4 min and a final extension of 60°C for 4 min. The microsatellite motifs were detected using SSRLocator version 1 software (Maia et al., 2008). From 96 sequences, 42 contained microsatellites. The most common motifs were dinucleotides (74%), followed by tetranucleotides (10%), and trinucleotides and pentanucleotides (8% each). From 42 sequences with microsatellite, 27 had suitable characteristics to design primer pairs with Primer3 software (Rozen and Skaletsky, 2000), from which 11 showed amplification patterns compatible with the expected fragment sizes.

Eleven microsatellite markers were characterized in *P. reticulata* using 60 adult specimens sampled in two conservation units in Southern Bahia, Brazil: RPPN Serra Bonita I (15°25'03" S, 39°32'47" W) (N = 30) and the RPPN Serra do Teimoso (15°09'19" S, 39°31'45" W) (N = 30). The distance between these populations is about 29 km. The PCR cocktail (13  $\mu$ L) consisted of 22.5 ng of genomic DNA, 1.3  $\mu$ L of 10x PCR buffer, 3.25 mM of each dNTP, 3.25 mg/mL of BSA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U of Taq DNA polymerase (Pharmacia, Belo Horizonte, Minas Gerais, BR), and a mixture of three primers, two (reverse primer and M13 tailed forward primer – CACGACGTTGTAAAACGA) with 3.9 mM and a dye-labeled M13 [6-FAM, VIC, PET or NED (Applied Biosystems)] primer with 1.43 mM. The PCR program consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35

cycles of 94°C for 1 min, 1 min at the specific annealing temperature of each primer pair (Table 1), 72°C for 1 min; 8 cycles of 94°C for 1 min, 53°C for 1 min, 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 15 min. Amplified fragments were subjected to capillary electrophoresis in multiplex systems on an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), and analyzed using GeneMarker version 1.95 software (SoftGenetics LLC., State College, Pennsylvania, USA).

**Table 1.1.** Description of eleven microsatellite loci for *Plathymenia reticulata*. Primer sequence are listed with motif repeat, annealing temperature ( $T_a$  °C), allele size range (bp), and GenBank accession number.

Locus	Repeat motif	Primer sequence (5' - 3')	$T_a$ (°C)	Allele size range (bp)	GenBank ID
Pr02	(GT) <sub>8</sub>	F: TTCAGATAAGGCCATGGTTC R: GCACAGCCTCACAAGAAGTT	56°C	282 - 334	JQ178255
Pr09	(TTAA) <sub>3</sub>	F: ACGTAGTTCTCGAGCGAAGG R: AAGCAACGAGCATTCAACTC	56°C	327	JQ797422
Pr14	(AC) <sub>10</sub>	F: TGTGTTATTCTTCGGCAAT R: ACTTGGCCACGATGAACTTA	56°C	221 - 249	JQ178256
Pr17	(GAG) <sub>4</sub>	F: CGACGAGACTGACTCCAAGT R: GTAGCCTGCAAGTCCACACT	56°C	277 - 293	JQ178257
Pr18	(GT) <sub>9</sub>	F: TCTTACTACGCTGCACACGA R: GTGAAGCGTCTAACCACACC	56°C	300 - 358	JQ178258
Pr21	(TG) <sub>12</sub>	F: GACCTCAGTCAATAGATGTGG R: AGCACACAAGGTAGTCAAGC	56°C	336 - 358	JQ178259
Pr30	(TG) <sub>11</sub> -(CT) <sub>7</sub>	F: CTCCTAGAATCAGCCAACCA R: ATGAATTCGATGTGCCTCC	57°C	232 - 250	JQ178260
Pr48	(TG) <sub>8</sub>	F: GCACAGCCTGATTATTGCTT R: AGCAAGGCAGAATTGAACAC	56°C	300 - 314	JQ178261
Pr57	(TTGCT) <sub>3</sub>	F: AGACACTGTTGGTATGAAGCA R: GAGCTAAGATACGCAATACGC	56°C	411	JQ797423
Pr71	(TG) <sub>10</sub>	F: ACGCTGAGGATCACAGGATA R: GAAGCGACAAGAACAACCAC	56°C	131 - 143	JQ178262
Pr80	(GA) <sub>8</sub> -(TTTTG) <sub>3</sub>	F: GTCTGCTTCTTCGTCATCGT R: TATCCATGGCCAAGTGTCT	56°C	376 - 400	JQ178263

Details like primer sequences, repeat motifs, GenBank accession numbers, annealing temperatures, and alleles ranges of eleven microsatellite loci are shown in Table 1. The number of alleles per locus ( $N_a$ ), observed and expected heterozygosity ( $H_O$  and  $H_E$ ) of each locus, and the combined exclusion probability ( $Q$ ), which corresponds to the probability with which a locus excludes an individual tree of being the parent of an offspring, were analyzed using CERVUS version 3.0.3 software (Kalinowski et al. 2007) (Table 2). Additionally, the MICRO-CHECKER software (van Oosterhout et al. 2004) was used to identify the possible occurrence of null alleles. From eleven markers tested, nine loci were polymorphic, with

maximum number of 11 alleles per locus, average of 4.39 alleles per locus, the  $H_O$  ranged from 0.00 to 0.77 and  $H_E$  ranged from 0.00 to 0.83 (Table 2). Null alleles may be present in the loci Pr21 and Pr48 in the RPPN Serra do Teimoso and for the loci Pr02 and Pr14 in both populations.

**Table 1.2.** Characterization of eleven microsatellite loci isolated from *Plathymenia reticulata*. For each primer is shown: number of alleles ( $N_a$ ), observed and expected heterozygosity ( $H_O$  and  $H_E$ ), and paternity exclusion probability ( $Q$ ).

Locus	RPPN Serra do Teimoso (15°09'19" S, 39°31'45" W)				RPPN Serra Bonita (15°25'03" S, 39°32'47" W)			
	$N_a$	$H_O$	$H_E$	$Q$	$N_a$	$H_O$	$H_E$	$Q$
Pr02	3	0.27	0.45	0.31	11	0.33	0.66	0.59
Pr14	9	0.53	0.76	0.71	7	0.50	0.71	0.68
Pr17	4	0.47	0.57	0.46	3	0.47	0.51	0.37
Pr18	2	0.57	0.50	0.28	5	0.53	0.52	0.41
Pr21	7	0.27	0.83	0.81	5	0.57	0.70	0.60
Pr30	2	0.03	0.03	0.03	2	0.17	0.21	0.16
Pr48	3	0.20	0.46	0.38	5	0.77	0.73	0.65
Pr71	3	0.67	0.64	0.49	4	0.57	0.69	0.59
Pr80	1	0.00	0.00	0.00	3	0.20	0.24	0.21
Average	3.78	0.33	0.47	0.99*	5	0.46	0.55	0.99*

\*Combined exclusion probability

The sampled individuals of RPPN Serra do Teimoso and RPPN Serra Bonita populations showed high and significant ( $p$ -value < 0.05) fixation index values ( $F = 0.294$  and  $0.176$ , respectively). The high values of fixation index estimates for both populations could be related to i) the strong evidence for null alleles detected in several loci and ii) the *P. reticulata* breeding system, since the species has hermaphroditic flowers, self-fertilization may occur. The average combined exclusion probability was 0.99996, revealing that these loci allow precise paternity testing. Linkage disequilibrium was tested in both populations using FSTAT (Goudet, 1995), and no disequilibrium between loci was detected at  $p$ -value < 0.05 when applying Bonferroni correction.

### 3. CONCLUSIONS

This study describes the first microsatellite markers for the tree species *Plathymenia reticulata*. These polymorphic markers can be used as tools to answer different ecological and evolutionary questions that will facilitate the research and the development of strategies for genetic conservation of the species in the Brazilian Atlantic forest and Cerrado.



#### 4. LITERATURE CITED

- BILLOTTE, N., P. J. L. LAGODA, A. M. RISTERUCCI, AND F. C. BAURENS. 1999. Microsatellite enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277–288.
- DOYLE, J. J., AND J. L. DOYLE. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- GOUDET, J. 1995. FSTAT: A computer program to calculate F-statistics, version 1.2. *Journal of Heredity* 86: 485 – 486.
- KALINOWSKI, S. T., M.L. TAPER, AND T. C. MARSHALL. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1006.
- MAIA L. C. DA, D. A. PALMIERI, V. Q. DE SOUZA, M. M. KOPP, F. I. F. DE CARVALHO, AND A. C. DE OLIVEIRA. 2008. SSR Locator: Tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation. *International Journal of Plant Genomics* 412696.
- MOORE, R. J. 1977. Index to plant chromosome number 1973-1974. *Regnum Vegetabile*. 91: 1-257.
- NOVAES, R. M. L., J. P. LEMOS-FILHO, R. A. RIBEIRO AND M. B. LOVATO. 2011. Phylogeography of *Plathymania reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology* 19: 985–998
- ROZEN, S., AND H. J. SKALETSKY. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In S. Krawetz and S. Misener [eds.], *Bioinformatics, methods and protocols: Methods in molecular biology*, 365–386. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
- VAN OOSTERHOUT C., W. F. HUTCHINSON, D. P. M.WILLS, P. SHIPLEY. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v.4, n.3, p.535-538.
- WARWICK M. C., AND G. P. LEWIS. 2003. Revision of *Plathymania* (Leguminosae-Mimosoideae). *Edinburgh Journal of Botany* 60:111-119.

---

## CAPÍTULO 2

---

**ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DE VINHÁTICO (*Plathymenia reticulata*,  
*Leguminosae*) EM SISTEMA AGROFLORESTAL CACAUEIRO - “CABRUCAS” DO  
SUL DA BAHIA, BRASIL.**

## RESUMO

*Plathymenia reticulata* é uma importante espécie arbórea tropical, que vem sendo removida ilegalmente da Mata Atlântica do sul da Bahia devido a sua madeira de excelente qualidade. Neste trabalho foram analisados nove locos microssatélites para investigar a diversidade genética, endogamia e estrutura genética espacial (EGE) em quatro populações de *P. reticulata* no sul da Bahia. Duas das populações encontram-se em unidades de conservação (UC) e duas em áreas de sistema agroflorestal conhecido como cabruca. Em cada área de amostragem, foram realizados censos de árvores adultas em parcelas de 16 ha, totalizando 440 indivíduos, estes foram mapeados e genotipados. Os resultados demonstram elevados níveis de endogamia em todas as populações estudadas, possivelmente produto da deriva genética. A análise da EGE revelou estruturação alta e significativa até 125 m na população mais conservada de UC e tendência à distribuição aleatória nas populações com histórico de perturbação, sendo encontrada ausência total de EGE em uma população de área de cabruca. A causa mais provável da estruturação observada é a dispersão restrita de sementes próxima às árvores-matriz, consistente com o modelo de isolamento por distância, que parece ser o padrão natural da espécie. Assim, os resultados aqui apresentados demonstram que a prática de corte de árvores (cabrucagem) para plantio do cacau-cabruca, afeta diretamente a diversidade e os padrões naturais de EGE de populações de *P. reticulata*. Implicações desses resultados para a conservação das populações da espécie são discutidas.

## 1. INTRODUÇÃO

A dispersão das espécies é um fator determinante na dinâmica de populações, comunidades e ecossistemas (HARDY et al., 2006). Alguns mecanismos biológicos das espécies tais como, sistema de reprodução, distribuição espacial e, especialmente o modo de dispersão de pólen e sementes, influenciam fortemente a estrutura genética espacial (EGE), isto é, a distribuição espacial não aleatória de genótipos e alelos dentro de populações (VEKEMANS e HARDY, 2004). Por outro lado, distúrbios como a fragmentação de hábitat e/ou perturbação humana, através da conversão de áreas florestais em terras agrícolas e corte de árvores madeireiras, também estão relacionados à modificação de padrões genéticos em populações de plantas (DEBOUT et al., 2011).

Do ponto de vista genético, a extração de madeira para exploração e/ou para implantação culturas de interesse econômico, levam à fragmentação do hábitat, reduz de forma drástica o número de indivíduos, altera o fluxo gênico entre e dentro das populações, tornando-as mais suscetíveis aos processos de deriva genética e endogamia, comprometendo a diversidade genética e a sobrevivência em longo prazo de populações de árvores (YOUNG et al, 1996; FRANKHAM, 2005). Nas últimas décadas houve um crescente interesse em avaliar as consequências genéticas da fragmentação de hábitat em espécies vegetais, levantando questões sobre a fragilidade genética de pequenas populações, estratégias genéticas para a conservação de espécies ameaçadas e/ou exploradas e problemas correlatos, os quais demandam informações sobre a variabilidade e estrutura genética de populações naturais (GAIOTTO et al., 2003; MORAES et al., 2005; AZEVEDO et al., 2007; BIZOUX et al., 2009; KYNDT et al., 2009; TARAZI et al., 2009; GONZALES et al., 2010; DEBOUT et al., 2011).

Nesse contexto, uma solução viável para manter a diversidade genética, restabelecer o fluxo gênico, expandir populações de espécies vegetais nativas da Mata Atlântica e conectar fragmentos florestais é o uso de sistemas agroflorestais (TARAZI et al., 2009). O sul do estado da Bahia caracteriza-se por apresentar um cenário perfeito para quantificar as consequências genéticas da perturbação florestal. Nesta região, ocorrem sistemas agroflorestais em larga escala, o plantio de cacau é estabelecido em sistema agroflorestal baseado na plantação de cacau sob a sombra das árvores remanescentes da Mata Atlântica, sistema este conhecido como “cabruca”. Essa paisagem é formada por uma matriz composta pelas cabucas, fragmentos florestais e outras formas de uso da terra, que atuam como

corredores ecológicos contribuindo para a conservação da diversidade biológica encontrada nessa região (SAMBUICHI e HARIDASAN 2007). Assim, a Mata Atlântica do sul da Bahia tem ganhado grande destaque, por seus elevados níveis de endemismo já registrados (AMORIM et al. 2008) e por possuir um dos maiores números de espécies arbóreas do Brasil e do Mundo (MARTINI et al., 2007).

Devido à grande extensão das áreas ocupadas pelas cabruças, em comparação com a pequena quantidade de floresta nativa remanescente, tem aumentado o interesse de pesquisadores em estudar a importância desse sistema agroflorestal para a conservação de espécies nativas (SAMBUICHI, 2002, 2006; FARIA e BAUMGARTEN, 2007; SAMBUICHI e HARIDASAN 2007; SAMBUICHI et al., 2008; PARDINI et al., 2009). Entretanto, o histórico de implantação e manutenção do sistema cabruca revela que, no passado diversas espécies arbóreas foram retiradas para plantio do cacau-cabruca. Essa prática conhecida como “cabrucagem”, tem como critérios o raleamento da floresta deixando somente as árvores que proporcionam sombreamento ao cacauzeiro. Assim, observa-se a substituição dos elementos do sub-bosque e a remoção de cerca de 90% das árvores nativas para inclusão de culturas de interesse econômico, além do cacau (SAMBUICHI, 2002). Além disso, muitas árvores foram suprimidas da Mata Atlântica do sul da Bahia para fins madeireiros desde a década de 1980 (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 1993). Entre as espécies arbóreas de interesse madeireiro encontradas nas cabruças do sul da Bahia, a espécie *Plathymenia reticulata* Benth. destaca-se por sua dominância.

*P. reticulata* é uma espécie arbórea tropical, diplóide ( $2n = 26$ ) (MOORE, 1977), popularmente conhecida como “vinhático”. É uma árvore decídua, com flores hermafroditas, mas com indícios para o modo reprodutivo ser principalmente de cruzamento (LACERDA et al., 2001). É polinizada, especialmente por abelhas generalistas e vespas, e suas sementes são dispersas pelo vento (GOULART et al., 2005). As árvores de *P. reticulata* podem chegar a 40 m de altura e até 1,5 m de diâmetro a altura do peito (observação pessoal), ocorrem tanto na Mata Atlântica como no Cerrado brasileiro. Estão distribuídas nessas áreas normalmente de forma irregular e descontínua, provocando densidades moderadas em determinadas áreas e ausência em outras (LORENZI, 2000). *P. reticulata*, é ainda, considerada importante espécie arbórea devido ao seu papel ecológico e grande valor econômico, devido à qualidade de sua madeira e seu potencial para a regeneração de áreas degradadas.

Contudo, *P. reticulata* encontra-se vulnerável à extinção, especialmente devido à perda de hábitat e ao corte seletivo de madeira (IUCN, 2011). Kyndt et al. (2009), sugerem

que uma comparação entre a EGE de populações com diferentes níveis de influência humana pode fornecer informações novas e interessantes, relacionadas aos efeitos em longo prazo de sistemas agroflorestais na genética de populações de árvores.

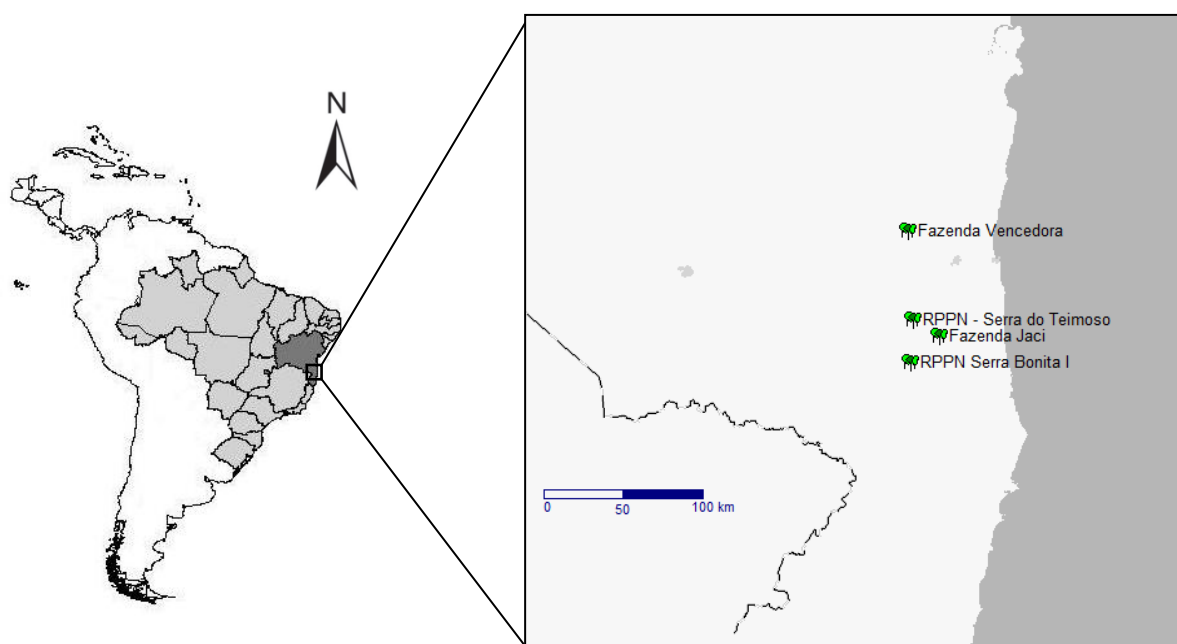
Assim, o principal foco deste trabalho foi conhecer a distribuição espacial de genótipos de *P. reticulata* dentro de quatro populações, duas provenientes de unidades de conservação e duas provenientes de sistema agroflorestal cabruca, no sul da Bahia, Brasil. O objetivo foi estimar e comparar a diversidade genética, fluxo gênico, tamanho efetivo populacional e a EGE de *P. reticulata*, entre populações conservadas e antropizadas, através de marcadores microssatélites. Acredita-se neste estudo que a cabrucagem, além de reduzir o número de indivíduos, promove a perda de alelos e genótipos afetando os padrões naturais de distribuição genética espacial dentro das populações de *P. reticulata*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Área de estudo

As áreas de estudo situam-se em quatro municípios da região Sul do estado da Bahia, Brasil (Figura 2.1). Esta região apresenta uma grande quantidade de fazendas com plantações de cacau com diversas intensidades de manejo, desde plantações ativas até áreas abandonadas desde 1980 (SAMBUICHI e HARIDASAN, 2007). Nesse cenário, localizam-se as cabruças, que podem variar de 70 a 25 anos de idade de implantação (SAMBUICHI e HARIDASAN, 2007). Segundo a classificação de Köppen, o clima predominante é Af, com uma precipitação anual de 1200 a 1300 mm e média de temperatura de 25° C. A vegetação predominante é a Floresta Ombrófila Densa (IBGE, 2009).

Para este estudo, foram selecionadas duas áreas de cabruças e duas de remanescentes florestais.



**Figura 2.1.** Localização geográfica das quatro áreas de amostragem de *P. reticulata*, situadas no sul do estado da Bahia, Brasil.

Dentre as quatro áreas de amostragem, a população da cabruca localizada na Fazenda Vencedora é a que se encontra mais distante, em relação às outras populações. A população de cabruca da Fazenda Jaci está situada entre as duas Unidades de Conservação estudadas, RPPN Serra do Teimoso e RPPN Serra Bonita. A distância entre as populações em pares pode ser visualizada na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Distância entre os pares de populações amostradas na região sul do estado da Bahia, Brasil. Cabruca da Fazenda Vencedora (Cab1), RPPN Serra do Teimoso (F1), Cabruca da Fazenda Jaci (Cab2) e RPPN Serra Bonita (F2).

Pontos de coleta	Distância geográfica (Km)			
	Cab1	F1	Cab2	F2
Cab1	0			
F1	59,827	0		
Cab2	73,467	19,899	0	
F2	88,688	28,983	25,582	0

### 2.1.1. Descrição das áreas estudadas

#### a) Cabruças

- ✓ **Fazenda Vencedora (Cab1):** situada no município de Coaraci (14°36'57" S e 39°33'12" W), é uma cabruca antiga sem idade exata definida, a fazenda pertence ao atual proprietário há pelo menos 80 anos. Antes desse período, por muitos anos práticas de roçagem (corte da vegetação rasteira) e extração de árvores madeireiras eram comuns, em toda a extensão da propriedade. Atualmente, a cabrucagem continua, porém não são mais retiradas árvores de *P. reticulata* e nem mesmo de outras espécies. Esta fazenda possui reserva legal conforme estabelecido pelo código florestal brasileiro (Lei Federal 4.771 de 1965, Art. 1º § 2º, inciso III incluído pela Medida Provisória nº 2.166-67, de 2001).
- ✓ **Fazenda Jaci (Cab2):** situada no município de Arataca (15°15'36" S e 39°22'32" W), essa propriedade compreende uma área de 254 hectares, contendo árvores da Mata Atlântica para sombrear o cacau. Há cerca de 50 anos a área foi aberta para exploração madeireira e cultivo do cacau. A partir de 2001 a fazenda passou a pertencer a Universidade Estadual de Santa Cruz, onde funciona a "Biofábrica de Cacau", que mantém na área destinada à cabruca, apenas árvores de cacau



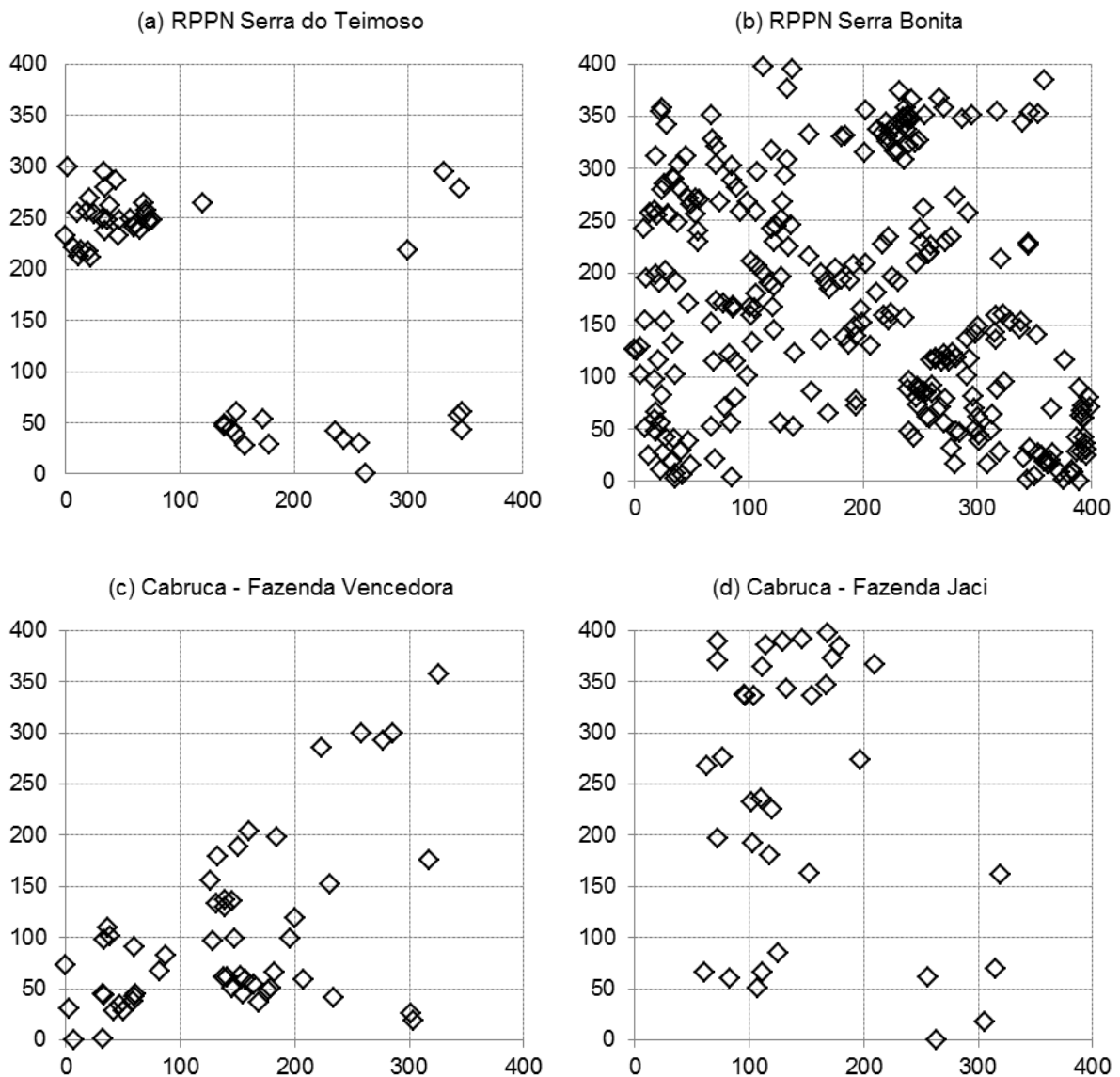
melhoradas, para comercialização de mudas. Desde então, não há mais retirada de árvores madeireiras.

#### **b) Unidades de Conservação (UC)**

- ✓ **RPPN Reserva Natural da Serra do Teimoso (F1):** localizada no município de Jussari (15°09'19" S e 39°31'45" W), é a mais antiga das RPPN da região, criada oficialmente no ano de 1996. Foi a primeira a ser reconhecida, após a assinatura do Decreto Federal 98.914, de 1990, que veio regulamentar a proteção de áreas em propriedades particulares. Situa-se na Fazenda Serra do Teimoso que abrange uma área total de 520,53 ha, sendo cerca de 200 ha destinados à área de reserva. Esta possui um dossel bastante descontínuo, com árvores de grande porte que podem atingir 50 m de altura e até 35 cm de diâmetro (REIS e FONTOURA, 2009). Antes mesmo de ser instituído o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC) pela Lei 9.985 de 2000 que criou a figura da Reserva Particular do Patrimônio Natural, a RPPN, os atuais proprietários já haviam registrado um refúgio de vida silvestre em sua propriedade. No entanto, o histórico da área revela que, embora, há aproximadamente 60 anos a área não é perturbada, a atual extensão destinada à reserva compreendia anteriormente uma cabruca, agora abandonada, onde as práticas de roçagem e exploração de espécies madeireiras eram comuns.
  
- ✓ **Serra Bonita I (F2):** situada na Fazenda Paris, possui uma área total de aproximadamente 200 ha, área bastante conservada convertida em RPPN no ano de 2004 e constituinte do complexo de RPPN Serra Bonita, localizada no município de Camacan (15°25'03" S e 39°32'47" W). Não há histórico de retirada de árvores nessa área. O complexo protege uma extensão considerável de Mata Atlântica (1,200 hectares), constituindo-se a segunda maior área de RPPN do Corredor Central da Mata Atlântica (MESQUITA, 2004) é considerada uma referência para a proteção dos remanescentes de Mata Atlântica de Altitude na região.

## 2.2. Amostragem e coleta

Uma parcela de 16 ha (400 x 400 m) foi instalada, de forma aleatória, nas áreas de estudo, onde foram realizados censos de *P. reticulata* com diâmetro à altura do peito (DAP)  $\geq$  25 cm (Figura 2.2). Considerou-se neste trabalho que as árvores com DAP  $\geq$  25 cm representam árvores adultas. Assim, todas as árvores adultas da parcela foram georreferenciadas com auxílio de aparelho GPS (Garmin GPSMAP 60CSX) e amostras de tecido de foliar foram coletadas para análise de DNA.



**Figura 2.2.** Localização e distribuição espacial das árvores de *Plathyomenia reticulata* amostradas em 16 ha de duas unidades de conservação: RPPN Serra do Teimoso (a), RPPN Serra Bonita (b) e de duas cabrucas: Fazenda Vencedora (c) e Fazenda Jaci (d).

### **2.3. Extração e quantificação de DNA**

As extrações de DNA foram realizadas seguindo o protocolo de Novaes et al. (2009). Para estimar a concentração e qualidade do DNA foram realizadas comparações com DNA padrão do fago  $\lambda$ , através de eletroforeses horizontais em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio. Em cada poço do gel acrescentou-se 2  $\mu$ L da amostra, 2  $\mu$ L de tampão de corrida (sacarose 1,6 mol.L<sup>-1</sup>, azul de bromofenol 1,6mmol.L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>O ultrapura). A quantificação foi visualizada por meio de sistema de fotodocumentação Image Quant 350 (GE Healthcare). O DNA foi diluído para concentração de uso de 7,5 ng/ $\mu$ L.

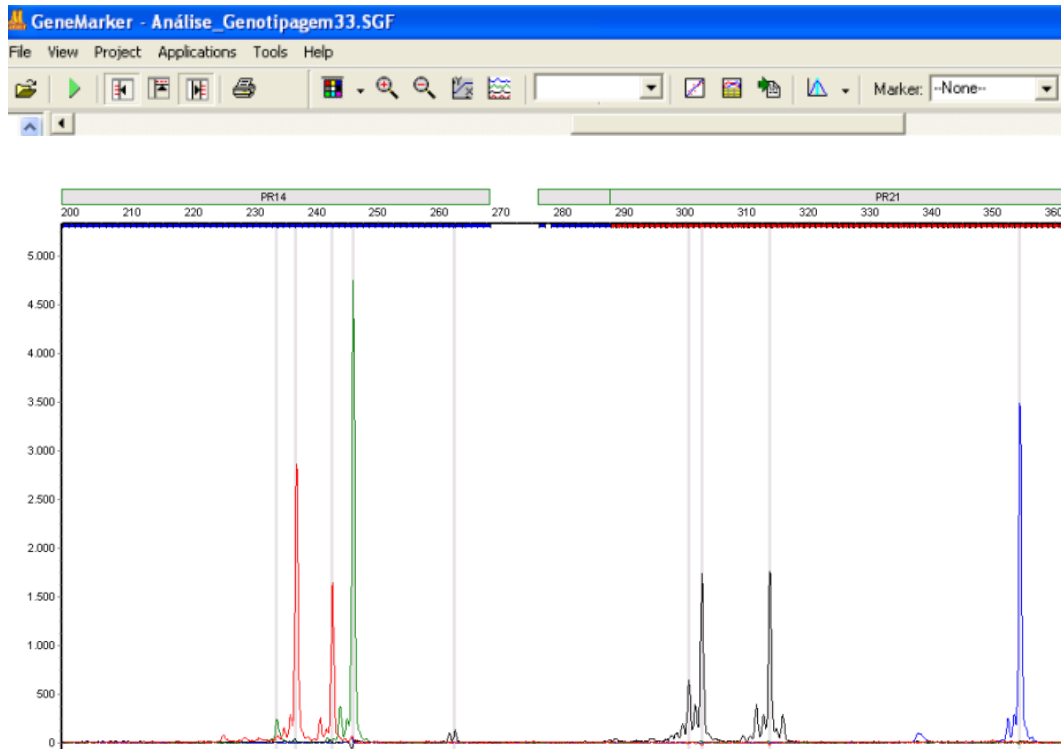
### **2.4. Condições de amplificação dos locos SSR**

Para as amplificações foram utilizados coquetéis de PCR (13  $\mu$ L) constituindo de 22,5 ng de DNA genômico, 1,3  $\mu$ L de tampão 10X de PCR, 1,3  $\mu$ L de cada dNTPs (2,5 mM), 1,3  $\mu$ L de BSA (2,5 mg/mL), 0,8  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,39  $\mu$ L da mistura do primer *forward* (10mM), contendo a sequência do iniciador M13(*tail*), e *reverse* (10mM), 1,43  $\mu$ L do *primer* cuja sequência é complementar ao *tail*, marcado com fluorescência (10mM), e 1 U de Taq DNA polimerase. O programa de termociclagem consistiu de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 1 min da temperatura de anelamento de 56°C ou 57°C de acordo com o par de primer (vide Tabela 1.1 do capítulo 1 desta dissertação), 72°C por 1 min; 8 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min, 72°C por 1 min, e uma extensão final a 72°C por 15 min.

### **2.5. Genotipagem**

As reações de PCR foram realizadas separadamente para cada loco, porém, realizou-se eletroforese multiloco. Para tal, os produtos de cada loco foram combinados em grupos de quatro e cinco locos, utilizando SSR marcados com diferentes fluorocromos, ou com mesmo fluorocromo, porém a partir de locos com amplitudes alélicas bem distintas. Quatro tipos de marcações (NED, PET, VIC e 6-FAM) foram utilizadas nos iniciadores marcados, de modo a maximizar o tempo e custo envolvidos na genotipagem, uma vez que tal procedimento aumenta a quantidade de locos analisados simultaneamente em uma única eletroforese, a exemplo da Figura 2.3. A mistura conteve 2  $\mu$ L dos fragmentos amplificados, mais 8  $\mu$ L de formamida HiDi e 0,25  $\mu$ L do marcador de tamanho padrão GS LIZ-500. Essa mistura foi desnaturada por 5 min a 95°C e submetida à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems).

A detecção e análise dos alelos em pares de base foi realizada com uso do software GeneMarker versão 1.95 (SoftGenetics LLC.). Os dados estimados pelo programa foram interpretados e corrigidos manualmente, e diretamente exportados para planilhas em Excel onde foram arredondados para números inteiros, definindo o genótipo de cada indivíduo.



**Figura 2.3.** Visualização dos alelos através do software GeneMarker. Os picos representam os alelos de um mesmo indivíduo, para quatro locos distintos. Estes são diferenciados através das quatro cores observadas. O marcador de tamanho padrão não está representado na figura.

## 2.6. Análise de dados

### 2.6.1. Análise da diversidade genética

As estimativas das frequências alélicas, juntamente com o número de alelos por loco ( $A$ ), o número efetivo de alelos por loco ( $\hat{A}_e = \frac{1}{1 - \hat{H}_e}$ ; NEI, 1987), da heterozigidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e dos índices de fixação ( $F$ ) conforme (WEIR, 1996), foram realizadas com auxílio do programa FSTAT (GOUDET, 2002). Para verificar a significância de  $F$  foi realizado o procedimento de 10.000 permutações sobre os locos ao nível de 5% de probabilidade, utilizando correção de Bonferroni. Para comparação das médias

de  $A$ ,  $A_e$ ,  $H_o$ ,  $H_e$  e  $F$  entre populações foi calculado um intervalo de confiança a 95% a partir do desvio padrão sobre os locos.

### 2.6.2 Estrutura genética espacial

Para a análise da estrutura genética espacial, foi utilizado o programa SPAGEDI (HARDY e VEKEMANS, 2002). A caracterização da distribuição espacial dos genótipos dentro da população foi realizada a partir das estimativas dos coeficientes de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) entre pares de plantas, dentro de diferentes classes de distância. O coeficiente de coancestria foi calculado com base no método de Loiselle et al. (1995). Para obter o intervalo de confiança a 95% de probabilidade foram realizadas 10.000 permutações de genótipos entre classes de distância.

Os valores de coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ), obtidos pelas classes de distâncias, foram comparados com os valores de classificação de parentesco já conhecidos no grau de irmãos-completos ( $\theta_{xy} = 0,25$ ), meios-irmãos ( $\theta_{xy} = 0,125$ ) e primos ( $\theta_{xy} = 0,0625$ ), com intuito de verificar a distância máxima nas quais os indivíduos encontravam-se relacionados geneticamente nesses graus de parentesco.

### 2.6.3 Correções do índice de fixação para o efeito Wahlund

Na presença de estrutura genética espacial, o valor do índice de fixação tende a se elevar dentro da população devido ao efeito Wahlund (DICK et al., 2008). Este índice de fixação intrapopulacional ( $F$ ) pode ser corrigido pela eliminação do efeito Wahlund, utilizando uma relação entre estatísticas  $F$ , como descrito em Bittencourt e Sebbenn (2007): onde a fórmula de Wright (1965):  $(1 - \hat{F}_{IT}) = (1 - \hat{F}_{IS})(1 - \hat{F}_{ST})$ , é derivada em  $\hat{F}_N = 1 - [(1 - \hat{F}) / (1 - \hat{\theta}_{xy})]$  assumindo que  $F_{ST} = \theta_{xy}$ , valor de  $\theta_{xy}$  corresponde à primeira classe de distância da análise da EGE;  $F_{IT} = F$ , já que o índice de fixação intrapopulacional ( $F$ ) representa o índice de fixação total dentro de uma população estruturada ( $F_{IT}$ ); e  $F_{IS} = F_N$  onde o novo valor corrigido do índice de fixação ( $F_N$ ) é a estimativa apenas relacionada com o sistema reprodutivo.

### 2.6.4 Estimativa do tamanho efetivo populacional, tamanho de vizinhança e área mínima viável para conservação

O tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) foi estimado na geração adulta conforme expressão derivada por Cockerham (1969), envolvendo as estimativas do índice de fixação ( $F$ ) e do coeficiente de coancestria médio ( $\Theta$ ) da geração sob consideração:

$$\hat{N}_e = \frac{0,5}{\hat{\Theta} \left( \frac{n-1}{n} \right) + \frac{1+\hat{F}}{2n}}.$$

Em que,  $n$  = tamanho amostral. O índice de fixação será estimado conforme previamente descrito no item 2.6.1. O coeficiente de coancestria médio dentro das diferentes populações foi estimado pela expressão:

$$\hat{\Theta} = \frac{n\hat{\theta}_{ii} + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n-1} \hat{\theta}_{ij} (1+\hat{F})}{n^2} \text{ (LINDGREN et al., 1996),}$$

em que,  $\theta_{ii}$  = estimativa da autoancestria dos indivíduos,  $\sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \theta_{ij}$  = soma de todas as estimativas das coancestrias entre os pares de indivíduos de uma população, excluindo a autoancestria,  $n$  = tamanho amostral e  $F$  = estimativa do índice de fixação da população.

O tamanho de vizinhança ( $N_b$ ) foi utilizado para estimar o número de genitores que trocam alelos ao acaso e a escala espacial do fluxo de genes, com auxílio do programa SPAGEDI (HARDY e VEKEMANS, 2002), através da expressão:

$$N_b = 4\pi D_e \sigma^2$$

onde  $D_e$  é a densidade populacional efetiva e  $\sigma^2$  é a medida da distância de dispersão.

A área mínima viável ( $AMV$ ) para conservação genética *in situ* foi estimada em função do tamanho efetivo de referência ( $N_{e(ref)} = 500$ ) proposto por Lynch (1996):

$$AMV = \frac{N_{e(ref)}}{d(\hat{N}_e/n)}$$

Em que,  $\hat{N}_e/n$  = relação entre o tamanho efetivo e o tamanho amostral e  $d$  = densidade de indivíduos por hectare.

### 2.6.5 Estrutura genética entre populações e fluxo gênico histórico

A estrutura genética e o fluxo gênico histórico entre as populações foram calculados com a finalidade de verificar se as mesmas representavam uma metapopulação. Para estas finalidades, foram estimadas as divergências genéticas com a estatística F de Weir e Cockerham (1984) ( $\hat{\theta}_p = F_{ST}$ ), segundo Slatkin (1995), com seu modelo para passos de mutação ( $R_{ST}$ ) e o  $G_{ST}$  proposto por Nei (1987) utilizando o programa computacional FSTAT (versão 2.9.3) de Goudet (2001). Para estandardizar o valor  $G_{ST}$  foi utilizado o  $G_{ST}'$ , proposto por Hedrick (2005).

O fluxo gênico histórico ou realizado ( $Nm$ ) entre populações foi estimado de forma indireta, segundo modelo de ilhas proposto por Crow e Aoki (1984), o qual corrige a análise para

pequeno número de populações:  $\hat{Nm} = \left(\frac{1}{4\alpha}\right) \left[ \left(\frac{1}{\hat{F}_{ST}}\right) - 1 \right]$ , em que  $\hat{F}_{ST}$  é a divergência

genética entre populações e (n) a correção para o número de populações, sendo:  $\alpha = [n/(n-1)]^2$ .

Os estimadores  $\hat{\theta}_p$ ,  $\hat{R}_{ST}$ ,  $\hat{G}_{ST}$  e  $\hat{G}_{ST}'$  foram usados no lugar do  $\hat{F}_{ST}$ , para conhecer a magnitude do fluxo gênico realizado e a variação dada por cada estatística.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Diversidade genética e endogamia

Dos 440 indivíduos amostrados de *P. reticulata*, foram analisados nove locos em 423 indivíduos, gerando um total de 216 alelos detectados. Os parâmetros de diversidade genética e índice de fixação das populações podem ser observados na Tabela 2.2. A maior média de alelos por loco ( $A_m$ ) foi observada na população da unidade de conservação F2 ( $A_m = 8,89 \pm 2,67$ , média  $\pm$  IC<sub>95%</sub>) seguida das populações de cabruca Cab1 ( $A_m = 5,67 \pm 1,81$ ) e Cab2 ( $A_m = 4,78 \pm 2,34$ ) e por último com o menor valor a população F1 ( $A_m = 4,67 \pm 2,05$ ). Em termos de número efetivo médio de alelos efetivos por loco ( $A_e$ ), o maior valor encontrado foi para população da cabruca Cab1 ( $A_e = 3,40 \pm 1,04$ ), em comparação com as demais F2 ( $A_e = 2,90 \pm 0,70$ ), F1 ( $A_e = 2,71 \pm 1,27$ ) e Cab2 ( $A_e = 2,67 \pm 1,09$ ). Um total de 37 alelos exclusivos ( $A_{ex}$ ) e de baixa frequência foi detectado entre as quatro populações, destes 28 pertencem à população F2, os demais se encontram distribuídos entre as populações Cab2 ( $A_{ex} = 4$ ), Cab1 ( $A_{ex} = 3$ ) e F1 ( $A_{ex} = 2$ ).

**Tabela 2.2.** Diversidade genética e índice de fixação de árvores adultas de quatro populações de *P. reticulata*.  $A$  = número de alelos;  $A_{ex}$  = número de alelos exclusivos;  $A_e$  = número efetivo de alelos;  $H_o$  = heterozigosidade observada;  $H_e$  = heterozigosidade esperada;  $F$  = índice de fixação; IC<sub>95%</sub> = intervalo de confiança a 95% calculado a partir do desvio padrão; \* = significativo a 0,05.

Loco	$A$	$A_{ex}$	$A_e$	$H_o$	$H_e$	$F$
(F1) - RPPN Serra do Teimoso ( $n = 47$ )						
Pr02	4	-	2,01	0,30	0,50	0,408*
Pr14	10	1	4,42	0,51	0,77	0,340*
Pr17	4	-	2,39	0,43	0,58	0,268
Pr18	3	1	2,00	0,51	0,50	-0,023
Pr21	9	-	6,54	0,30	0,85	0,648*
Pr30	2	-	1,07	0,06	0,06	-0,022
Pr48	3	-	1,97	0,28	0,49	0,439*
Pr71	4	-	2,91	0,62	0,66	0,059
Pr80	3	-	1,07	0,02	0,07	0,664*
Média	4,67	-	2,71	0,34	0,50	0,309*
IC <sub>95%</sub>	$\pm 2,05$	-	$\pm 1,27$	$\pm 0,15$	$\pm 0,20$	$\pm 0,190$
Total	42	2	24,37	-	-	-



## (F2) - RPPN Serra Bonita (n =278)

Pr02	17	9	3,26	0,29	0,69	0,580*
Pr14	10	-	3,85	0,46	0,74	0,380*
Pr17	4	-	2,50	0,49	0,60	0,185*
Pr18	9	5	2,20	0,39	0,55	0,288*
Pr21	9	-	4,00	0,66	0,75	0,116*
Pr30	5	1	1,36	0,26	0,26	0,002
Pr48	8	4	3,17	0,54	0,69	0,212*
Pr71	10	5	3,91	0,53	0,74	0,283*
Pr80	8	4	1,86	0,22	0,46	0,514*
Média	8,89	-	2,90	0,43	0,61	0,284*
IC <sub>95%</sub>	±2,67	-	±0,70	±0,11	±0,12	±0,134
Total	80	28	26,10	-	-	-

## (Cab1) - Cabruca Fazenda Vencedora (n =53)

Pr02	8	1	4,08	0,38	0,76	0,500*
Pr14	7	-	2,79	0,19	0,64	0,706*
Pr17	4	-	3,92	0,28	0,75	0,620*
Pr18	4	-	2,24	0,50	0,55	0,097
Pr21	11	2	6,41	0,50	0,84	0,408*
Pr30	4	-	2,16	0,66	0,54	-0,233
Pr48	4	-	3,08	0,53	0,68	0,216
Pr71	5	-	4,17	0,57	0,76	0,255
Pr80	4	-	1,78	0,04	0,44	0,912*
Média	5,67	-	3,40	0,40	0,66	0,387*
IC <sub>95%</sub>	±1,81	-	±1,04	±0,15	±0,09	±0,266
Total	51	3	30,63	-	-	-

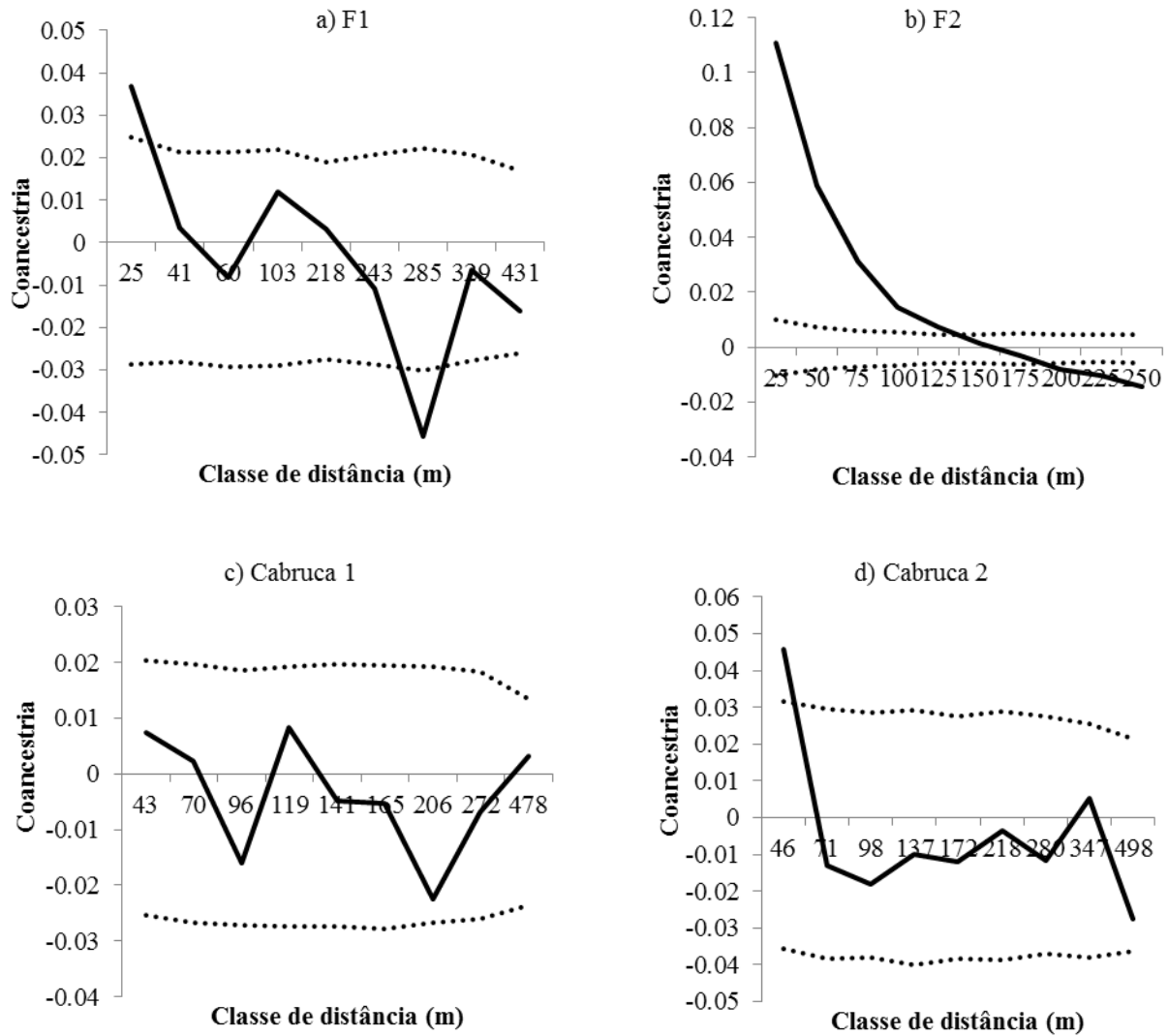
## (Cab2) - Cabruca Fazenda Jaci (n =45)

Pr02	2	-	1,90	0,07	0,47	0,859*
Pr14	12	2	5,52	0,48	0,82	0,417*
Pr17	3	-	2,12	0,38	0,53	0,285
Pr18	4	1	1,83	0,45	0,46	0,001
Pr21	7	-	4,31	0,36	0,77	0,526*
Pr30	1	-	1,00	0,00	0,00	0,000
Pr48	4	-	2,29	0,35	0,56	0,382*
Pr71	5	-	3,68	0,50	0,73	0,313*
Pr80	5	1	1,34	0,19	0,26	0,272
Média	4,78	-	2,67	0,31	0,51	0,339*
IC <sub>95%</sub>	±2,34	-	±1,09	±0,13	±0,19	±0,190
Total	43	4	24	-	-	-

A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) foi menor que a esperada ( $H_e$ ), nas quatro populações analisadas (Tabela 2.2), sugerindo um excesso de homozigotos em relação ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este padrão fica mais claro observando o índice de fixação ( $F$ ). As médias do índice de fixação por loco evidenciaram um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 2.2), nas quatro populações amostradas F1 ( $F = 0,309$ ), F2 ( $F = 0,284$ ), Cab1 ( $F = 0,387$ ) e Cab2 ( $F = 0,339$ ).

### **3.2. Estrutura genética espacial**

A distribuição espacial de genótipos a partir da análise do coeficiente de coancestria entre pares de árvores dentro de diferentes classes de distância (Figura 2.4) demonstrou que das quatro áreas analisadas, apenas a população da unidade de conservação Serra Bonita (F2) apresentou forte EGE. A estrutura familiar se deu até a quinta classe de distância de 125 m (Figura 2.4. b), positiva e significativa de acordo com os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade. O coeficiente de coancestria mais alto encontrado para essa população ( $\theta_{xy} = 0,111$ ) foi estimado na primeira classe de distância de 0 a 25 m, próximo ao equivalente a meios-irmãos ( $\theta_{xy} = 0,125$ ). Para as outras populações dessa espécie a EGE estava praticamente ausente em todo contínuo analisado, apenas uma fraca significância foi observada para a população F1 (Figura 2.4. a) na primeira classe de distância de 25 m, com coeficiente de coancestria estimado ( $\theta_{xy} = 0,035$ ) próximo ao esperado entre indivíduos primos de segundo grau ( $\theta_{xy} = 0,03125$ ); e para população Cab2 (Figura 2.4. d) na segunda classe de distância a 50 m e coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy} = 0,042$ ) próximo ao esperado entre primos de segundo e primeiro grau ( $\theta_{xy} = 0,0625$ ). Já para população da cabruca Cab1 a estrutura familiar foi ausente (Figura 2.4. c).



**Figura 2.4.** Correlograma representativo do coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) em diferentes classes de distâncias entre pares de árvores adultas de *Plathymenia reticulata*, localizadas em duas unidades de conservação: a) RPPN Serra do Teimoso – F1; b) RPPN Serra Bonita – F2; e duas cabruças: c) Fazenda Vencedora – Cab1 e d) Fazenda Jaci – Cab2. Linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

### 3.3. Correções do índice de fixação para o efeito Wahlund

Os índices de fixação corrigidos ( $F_N$ ) foram de 0,284, 0,195, 0,370 e 0,320, demonstrando que 8%, 31%, 4% e 5% dos valores de  $F$  para as populações F1, F2, Cab1 e Cab2, respectivamente, foram devido ao efeito Wahlund.

### 3.4. Tamanho efetivo populacional, tamanho de vizinhança e área mínima viável para conservação

O tamanho efetivo intrapopulacional ( $N_e$ ) dos 49, 289, 53 e 49 indivíduos adultos de *P. reticulata* amostrados em áreas de 16 ha em quatro populações do sul da Bahia, o tamanho de vizinhança e a extensão do fluxo de genes em metros ( $\sigma^2$ ) a AMV baseando-se no tamanho efetivo de referência de 500 para conservação, propostos por Lynch (1996) estão apresentados na tabela 2.3.

**Tabela 2.3.** Estimativa do tamanho efetivo populacional e da área mínima viável para as populações de *P. reticulata*, do sul da Bahia.  $n$  = número de indivíduos;  $N_e$  = tamanho efetivo;  $N_b$  = tamanho de vizinhança;  $\sigma^2$  = medida de dispersão em metros;  $d$  = relação de indivíduo por hectare;  $AMV_{(referência)}$  = área mínima em hectares viável para conservação.

População	$n$	$N_e$	$N_b$	$\sigma^2$	$d$	$AMV_{(500)}$
F1	49	12	70,30	138,01	2,94	694,15
F2	289	16	35,66	39,63	18,06	503,37
Cab1	53	11	NC*	NC*	3,31	729,74
Cab2	49	11	NC*	NC*	3,06	729,46

NC= Não convergiu para tamanho de vizinhança

### 3.5. Estrutura genética entre populações e fluxo gênico histórico

Uma moderada divergência genética foi revelada através dos valores relativamente baixos dos estimadores analisados entre as quatro populações de *P. reticulata* estudadas e entre pares de populações, à exceção do  $G_{ST}'$  (Tabela 2.4). A menor divergência genética encontrada foi referente ao par de populações da RPPN Serra do Teimoso (F1) e cabruca da Fazenda Jaci (Cab2), enquanto a maior divergência genética foi observada entre as populações da RPPN Serra do Teimoso (F1) e cabruca da Fazenda Vencedora (Cab1), (Tabela 2.4). Os mesmos pares de populações foram os que também apresentaram maior e menor número de migrantes por geração, respectivamente. Quando analisado o conjunto das populações analisadas, verificou-se que a divergência genética populacional e o padrão de fluxo gênico histórico não se distribuíram igualmente entre as populações (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4** – Valores de divergência genética e fluxo gênico histórico ( $N_m$ ) entre quatro populações de *Plathymenia reticulata* do sul da Bahia.

Populações	$R_{ST}$	$\theta$	$G_{ST}$	$G_{ST}'$	$N_{m(R_{ST})}$	$N_{m(\theta)}$	$N_{m(G_{ST})}$	$N_{m(G_{ST}')}$
F1 x F2	0,07	0,05	0,03	0,10	0,83	1,16	2,17	0,58
F1 x Cab1	0,08	0,10	0,05	0,19	0,73	0,59	1,16	0,26
F1 x Cab2	0,02	0,02	0,01	0,03	2,94	3,06	6,19	2,00
F2 x Cab1	0,05	0,04	0,02	0,09	1,19	1,46	3,06	0,64
F2 x Cab2	0,04	0,04	0,02	0,07	1,60	1,72	3,23	0,87
Cab1 x Cab2	0,05	0,09	0,05	0,17	1,13	0,67	1,33	0,30
Todas	0,054	0,047	0,044	0,161	2,47	2,85	3,06	0,73

## 4. DISCUSSÃO

A análise da estrutura genética espacial (EGE) de uma espécie é um método eficaz para determinar as principais direções da história demográfica de suas populações e para estimar o grau de dispersão gênica. Apesar do crescente número de publicações discutindo EGE em populações de espécies arbóreas, até o presente momento, nenhum estudo relacionou este parâmetro ao modo de implantação de um sistema agroflorestal tal como ocorre na Cabruca. Assim, este é o primeiro trabalho que trata da EGE em populações de *P. reticulata*, comparando populações de áreas conservadas e áreas exploradas, buscando prever o possível impacto da cabrucagem na EGE das populações dessa espécie. Os resultados genéticos obtidos a partir de marcadores microssatélites inéditos específicos para *P. reticulata* permitiram mostrar implicações para conservação das populações desta espécie na paisagem cacaueteira do sul da Bahia e também como realizar conservação *ex situ*.

### 4.1. Diversidade genética e endogamia

A diversidade genética nas populações de *P. reticulata* foi baixa e não houve diferença significativa entre as populações de áreas conservadas e de área de cabruca. Os indivíduos aqui avaliados foram os adultos da população e reflete a diversidade genética que existia no passado, quando essas populações eram interligadas. As consequências da cabrucagem podem vir a ser evidenciadas nas próximas gerações daquelas populações que sofreram o impacto.

A população F2 (sem histórico de perturbação) possui o maior número de indivíduos e, conseqüentemente apresentou maior diversidade genética em termos de número de alelos, quando comparada com as outras três populações que sofreram impacto antrópico. A população Cab1 apresentou o maior número efetivo de alelos na população. Esse resultado representa a possível perda de alelos, inclusive os raros, que ocorreu nessa população, provavelmente, como consequência dos indivíduos que foram retirados devido ao processo de cabrucagem ocorrente nessa população. As frequências alélicas são de fundamental importância para as medidas de alelos efetivos e heterozigosidade esperada, uma vez que os alelos de baixa frequência (frequência alélica entre 0,05 a 0,25) ou raros (frequência menor que 0,05) não contribuem para essas medidas, já que valores baixos de frequências alélicas elevados ao quadrado geram valores ainda mais baixos.

Um grande número de alelos raros e exclusivos foi observado na população conservada F2, em relação ao encontrado para as demais populações exploradas analisadas. Embora em números muito baixos, as populações de cabruca ainda mantêm alelos exclusivos e raros. Estes tipos de alelos são levados em consideração, como um dos parâmetros utilizados para decisões conservacionistas em populações naturais de espécies arbóreas (KALINOWSKI, 2004).

Assim, até certo modo, o sistema cacau-cabruca manteve na região um patrimônio genético importante para a manutenção da espécie, aliando a participação do segmento rural na conservação dos recursos naturais, quando comparado a cultivos agrícolas fundamentados na retirada completa da vegetação existente. Contudo, devido à crise que afetou a cacauicultura desde o final de 1980, além de resultados que demonstram aumento da produtividade quando o cacauzeiro está a pleno sol, as cabrucas estão em processo de plena substituição da atividade agrícola, ocorrendo de forma mal planejada. Estão, sob forte pressão antrópica e correm risco de desaparecer, comprometendo a sobrevivência das espécies arbóreas de interesse econômico, social e ecológico, bem como a fauna silvestre associada.

A heterozigosidade média observada foi menor que a esperada, em todas as populações, indicando taxa relativamente alta de endogamia visualizada pelos altos valores do índice de fixação. As reduções no número de indivíduos, através da prática de cabrucagem, pode ser a causa da baixa variabilidade genética observada. Segundo Defavari et al. (2009) a heterozigosidade nos locos polimórficos pode estar associada às reduções recentes no número efetivo da população.

Altos níveis de endogamia foram encontrados entre as quatro populações, de modo que parte desses valores é proveniente do efeito Wahlund, considerando o fato de que a população é geneticamente estruturada. De acordo com Wright (1931), em uma população subdividida a probabilidade de cruzamentos entre indivíduos aparentados aumenta e, conseqüentemente, eleva a coancestria e a endogamia, reduzindo a proporção de heterozigotos na população. Mesmo após a correção do efeito Wahlund, o novo índice de fixação corrigido continuou alto, nas quatro populações. Observou-se ainda, que as mais altas estimativas do índice de fixação foram detectadas nas três populações que apresentam histórico de perturbação (F1, Cab1 e Cab2). Conte et al. (2006), observaram essa mesma tendência, analisando populações de *Euterpe edulis* não perturbadas com populações exploradas da espécie, no sul do Brasil.

Os altos valores das estimativas do índice de fixação nas populações analisadas poderiam estar relacionados com fatores como i) deriva genética, que através da mudança nas frequências alélicas dessas populações poderia aumentar a frequência de genótipos com alelos homólogos, ii) alelos nulos, através do aumento da homozigose e redução da heterozigidade, dado que heterozigotos para alelos nulos serão interpretados como homozigotos por falhas na amplificação via PCR devido a mutações que ocorrem nas sequências flanqueadoras impedindo o anelamento do primer não sendo possível, portanto, detectar o alelo em questão, iii) o sistema reprodutivo de *P. reticulata*, que favorece a interpretação de que a espécie seja realmente endogâmica, uma vez que possui flores hermafroditas, a autofertilização pode ocorrer.

#### **4.2. Estrutura genética espacial**

Uma EGE forte e positiva foi detectada nas primeiras classes de distância (0 a 125 m) na população da RPPN Serra Bonita. Esta EGE diminui à medida que a distância aumenta, ocorrendo então, autocorrelações negativas e significativas nas quatro últimas classes de distância (Figura 2.4.b). O maior coeficiente de coancestria detectado ( $\theta_{xy} = 0,111$ ) foi encontrado na primeira classe de distância, o equivalente a meios-irmãos. Estes resultados sugerem uma dispersão limitada de pólen e, sobretudo de sementes, dentro desse espaço. Pois, embora o movimento de genes em populações de plantas envolve tanto o pólen como as sementes, supõe-se que a EGE dentro das populações é mais fortemente ocasionada pela dispersão de sementes (CHUNG et al., 2000). No vinhático a polinização é realizada principalmente por abelhas, onde se espera que o pólen viaje a distâncias maiores, e a dispersão de sementes é realizada principalmente pelo vento e ação da gravidade. Assim, se o pólen é disperso mais amplamente do que as sementes, a EGE será mais influenciada por alelos maternos e determinadas mais pela dispersão de sementes do que pela dispersão de pólen (SEBBENN et al., 2011). Com isso, muitas das sementes podem ser dispersas nas vizinhanças das árvores maternas, dando origem à estrutura genética espacial. Esse mecanismo de dispersão de sementes na vizinhança das árvores matrizes, com poucas sementes depositadas no aumento das distâncias é esperado em espécies arbóreas tropicais (VEKEMANS e HARDY, 2004), gerando uma distribuição espacial agregada (JONES et al., 2005) e estruturação genética intrapopulacional.



Dessa forma, as árvores de vinhático amostradas na população conservada F2 cuja localização se encontra até 125 m de distância entre si devem apresentar algum grau de parentesco e, após essa distância as árvores passariam a apresentar um padrão aleatório e divergente em termos de frequências alélicas, gerando o mecanismo conhecido como isolamento por distância. O modelo de isolamento por distância proposto por Wright (1943) prevê aumento do parentesco genético entre as árvores, como resultado da dispersão de sementes localmente restritas.

Diante do exposto, espera-se que as populações de vinhático, pelos seus mecanismos de fluxo gênico, expressados a partir do padrão observado para população conservada da RPPN Serra Bonita (sem histórico de perturbação), apresentem estrutura genética espacial intrapopulacional. No entanto, a população da RPPN Serra do Teimoso, ainda que se encontre em uma unidade de conservação, apresentou um padrão de distribuição genética espacial aleatório, com uma estruturação de baixa magnitude na primeira classe de distância (0 a 25 m), o que leva a concluir que a EGE na população dessa área é praticamente ausente (Figura 2.4.a). Isso está fortemente associado ao histórico de exploração madeireira e, aos cortes seletivos associados com a manutenção da cabruca que antes existia na atual área de preservação. Essas práticas provavelmente foram os motivos, que fazem com que essa área de conservação apresente hoje, a menor densidade de vinhático adulto por hectare, colocando-a, inclusive, em posição inferior a áreas atuais de cabrucas. (Tabela 2.3).

A mesma tendência foi observada para a população da cabruca localizada na Fazenda Jaci, já para cabruca da Fazenda Vencedora foi constatada a ausência total de EGE. Esses resultados já eram esperados para áreas de cabruca, visto que essas áreas guardam uma história de intensa exploração associada ao corte de espécies madeireiras - “cabrucagem”, o que demonstra ter desconfigurado o padrão natural de distribuição genética espacial da população.

Esses resultados demonstram claramente que a EGE de *P. reticulata* é significativamente influenciada por corte e exploração madeireira, corroborando com a hipótese de estudo, e por isso, as interpretações de estrutura genética espacial nessa espécie devem levar em conta o histórico de perturbação da área onde suas populações estão localizadas.

### 4.3. Tamanho efetivo populacional, tamanho de vizinhança e área mínima viável para conservação.

A estimativa do tamanho efetivo para as populações analisadas neste estudo foi menor que 50 indivíduos, sendo insuficiente para manter a endogamia estável em curto prazo, de até dez gerações (FRANKEL; SOULÉ, 1981). O tamanho efetivo populacional é um parâmetro fundamental para a avaliação do impacto da deriva sobre a estrutura genética de populações. O resultado de  $N_e$  inferior a 50, observado nas populações, pode ser um reflexo dos efeitos das ações antrópicas ocorridas nas áreas. Diferenças entre  $N_e$  e  $n$  estão associadas à ocorrência de oscilações genéticas, a alta proporção de indivíduos endogâmicos (alto valor de  $F$ ) e também ao parentesco entre os indivíduos. Quanto maior o  $N_e$  em uma população menor a magnitude da deriva genética e dos efeitos gerados por endogamia. Assim, o tamanho efetivo de cada população representa aqueles indivíduos que podem contribuir efetivamente para as próximas gerações.

Em espécies que apresentam cruzamentos (parcial ou total), o  $N_e$  é uma região de um continuum populacional em que os genitores do indivíduo localizado em seu centro podem ser quaisquer adultos amostrados aleatoriamente (Wright 1969). A vizinhança representa uma escala geográfica determinada pela dispersão dos genes dentro de uma geração. Os valores de  $N_b$ , bem como o de  $N_m$ , determinam se a deriva genética, por si só, pode produzir variabilidade genética substancial entre locais. Neste estudo, a partir dos valores de  $N_b$ , estimaram-se as áreas de vizinhança para cada uma das populações de vinháticos adultos. Na população F1  $N_b$  foi de 70 com distância de dispersão de 138m, dessa forma, seriam necessários cerca de 70 indivíduos reprodutivos para manter a estrutura genética atual nas populações investigadas de *P. reticulata*. Todavia, o número amostral foi inferior ao tamanho de vizinhança esperado ( $n < N_b$ ). Porém, observa-se que o raio de dispersão (138m) está contido na área (400m x 400m) em que realizamos o censo amostral, logo os fenômenos de dispersão e polinização dessa *deme* estariam englobados na amostragem. Contudo a divergência observada entre os valores de  $n$  e  $N_b$ , ou seja, a não localização dos indivíduos que originaram a *deme* atual, pode ter sido causada pela perda desses indivíduos devido à prática de cabrucagem ocorrida nessa área no passado. De modo que, se o número de indivíduos em uma mesma unidade de área é inferior ao tamanho de vizinhança esperado, é possível que ocorra o aumento da divergência entre as vizinhanças, através da diminuição da troca de genes entre elas e do incremento interno dos níveis de endogamia, alterando a

estrutura genética da população em médio prazo (BOTREL et al., 2006). Quando comparados esses resultados com o obtido para a população F2 (sem histórico de cabrucagem), observa-se que a população amostral ( $n= 289$ ) atende aos parâmetros encontrados para o tamanho de vizinhança ( $N_b$ ) de 35 indivíduos com distância de dispersão de aproximadamente 40m. Isto implica que essa população apresenta número de genitores suficientes para troca de genes ao acaso. Esses dados alertam também para o fato de que se a cada 35 indivíduos retirados dessa população, ou ainda, a retirada total de árvores adultas em um raio de 40 metros resultaria na perda de demes únicas, podendo aumentar a divergência entre a vizinhança. Não foi possível estimar o  $N_b$  para as populações das áreas de cabruca, uma vez que os dados são inconsistentes para o modelo de equilíbrio entre deriva e dispersão, que é utilizado como princípio para a estimativa de tamanho de vizinhança.

Apenas a manutenção de um tamanho efetivo adequado não garante a persistência de populações ao longo de várias gerações. Por isso, foi considerada também a área mínima viável para manter uma população mínima eficaz para a conservação. Assim, tomando como base um  $N_{e(\text{referência})}$  de 500, é observado que as áreas de 200 ha destinadas às RPPNs, assim como a extensão da área das cabucas analisadas, são insuficientes para manter uma  $AMV_{(500)}$ , valor necessário para garantir a manutenção da diversidade dessas populações a longo prazo. Contudo, essas áreas representam apenas uma pequena fração da extensão total do fragmento florestal onde estão inseridas, sendo assim, possivelmente o número de indivíduos existentes na área total podem vir a ser suficientes para manutenção desses valores. Felizmente ainda existem diversos remanescentes florestais de tamanho similar, ou maiores que este limite. No entanto, o isolamento é o principal fator ameaçando populações de *P. reticulata*. Dessa forma, o principal problema a ser atualmente resolvido seria encontrar uma forma de possibilitar a conectividade entre os fragmentos, permitindo o fluxo gênico e, conseqüentemente, a redução dos efeitos da deriva e endogamia, aumentando assim, os níveis de diversidade genética das populações de *P. reticulata* a médio e longo prazo.

#### **4.4. Estrutura genética entre populações e fluxo gênico histórico**

Quando analisado o conjunto de todas as populações, verificou-se que a divergência genética populacional é moderada e que, em geral, as populações geograficamente mais próximas apresentaram menor divergência genética. As maiores divergências genéticas, foram observadas quando o pareamento era realizado com a população Cab1, indicando que as

populações F1, F2 e Cab2 são mais similares entre si e tendem a divergir da população Cab1 (Tabela 2.4). Esse argumento pode ser sustentado pelo fato de que a população Cab1 encontra-se separada a uma distância considerável das demais populações (cerca de 88 Km em linha reta), o que dificulta a troca de alelos entre elas e, conseqüentemente aumenta a divergência genética devido à descontinuidade espacial. Além disso, a população Cab2 está localizada entre as populações F1 e F2 e, provavelmente, atua como um “*stepping-stone*”. Evidência que fica ainda mais clara, quando observado que a menor divergência genética se encontra entre o par mais próximo geograficamente F1 e Cab2, distantes cerca de 20 km entre si, seguida do par F2 e Cab2, separadas por uma distância menor do que 26 km. Os valores de fluxo gênico entre as populações F1, F2 e Cab2 corroboram esta hipótese (Tabela 2.4, Figura 2.1).

A diferença nas estimativas de divergência genética (Tabela 2.4) é devido à diferenças nos métodos de cálculo. O  $G_{ST}$  estimado de acordo com Hedrick (2005) foi superior ao  $\theta$  estimado pelo método de Weir e Cockerham (1984) e ao parâmetro  $R_{ST}$ . Isso porque o parâmetro genético de Hedrick (2005) considera o tipo de alelos encontrados nas populações e as frequências alélicas, enquanto que o método de Weir e Cockerham (1984) considera apenas a variação nas frequências alélicas. Além disso, o  $G_{ST}$  possui grande sensibilidade à locos com altas taxas mutacionais, como é o caso dos marcadores microssatélites. Tornando suas medidas em grande parte insensíveis à variação no processo evolutivo e, por essa razão, seu uso associado a esse tipo de marcador vem sendo desmotivado (WHITLOCK, 2011).

Com exceção do Número de migrantes ( $N_m$ ) baseado no estimador  $G_{ST}$ , todos os demais estimadores revelaram um fluxo gênico histórico maior do que dois migrantes por geração. Este fluxo gênico calculado a partir da divergência genética dos indivíduos adultos das populações reflete um acontecimento passado, quando as populações eram interligadas por florestas praticamente contínuas. Indicando que, pelo menos no passado, o fluxo gênico era suficiente para evitar uma diferenciação populacional devido à deriva genética.

Esse fluxo gênico não indica, necessariamente, estar havendo troca gênica em determinado evento reprodutivo, mas estima os níveis de fluxo gênico que devem ter ocorrido para produzir os padrões observados de estrutura genética (SOUZA et al., 2007). Segundo Futuyma (2002), tratando-se de genes neutros, faz-se necessário pelo menos um migrante por geração para impedir o efeito de deriva genética nas populações, podendo essas ser consideradas como uma metapopulação. A alta taxa de fluxo gênico homogeniza as diferenças genéticas entre as populações, mesmo na presença de seleção intensa (ZUCCHI, 2005).

Contudo, considerando se tratar de espécie arbórea de ciclo de vida longo e isoladas em fragmentos espera-se que as próximas gerações apresentem um aumento nos níveis de diferenciação genética entre populações, por deriva.

Por essa razão, é de extrema importância avaliar o fluxo gênico contemporâneo, através da análise de paternidade, a fim de fazer-se inferência no nível atual de isolamento genético destas populações e das eventuais potencialidades para sobreviverem ou divergirem em termos genéticos de outras populações em longo prazo.

#### **4.5. Implicações para conservação**

Os princípios da genética da conservação desempenham um papel importante na conservação de muitas espécies. Os resultados obtidos neste trabalho para as populações de *P. reticulata*, têm implicações diretas para a conservação genética desta espécie arbórea madeireira tropical. O alto índice de indivíduos endogâmicos encontrado nas populações estudadas, se traduz em um maior potencial para depressão por endogamia, o que implicaria na redução da capacidade de adaptação das populações em sucessivas gerações, o que pode ser prejudicial para a conservação da espécie por longo prazo.

Sem histórico de perturbação, a população da unidade de conservação (F2) revelou forte EGE sugerindo ser esse o padrão natural em *P. reticulata*. Portanto, a ausência de EGE pode indicar perturbações antrópicas, como a cabrucagem, o que pode ser observado nas outras três populações estudadas. Tarazi et al. (2009) obtiveram tendência semelhante em populações de *Ocotea catharinensis*. Esta intensa estruturação observada em F2 está relacionada ao modelo de fluxo gênico de isolamento por distância, o que provoca a formação de demes em áreas contínuas. Por isso, sugere-se a conservação *in situ* de grandes áreas, no sentido de evitar a perda de subpopulações devido à exploração seletiva. Esta, mesmo após as proibições ao desmatamento e à comercialização de madeira nativa do bioma Mata Atlântica (Lei Federal 11.428/2006), ainda representa um risco potencial para espécie. Além disso, os resultados revelam que a coleta de propágulos e sementes para programas de conservação *ex situ* e recuperação de áreas degradadas, na população da RPPN Serra Bonita (F2), devem ser realizadas em distâncias superiores a 125 m. Essa estratégia busca evitar a amostragem de árvores aparentadas que representam apenas um subconjunto da diversidade genética, o que poderia vir a reduzir o tamanho efetivo na população descendente (BIZOUX et al., 2009). Para as demais três populações estudadas, a coleta de propágulos e sementes pode se dá em

qualquer nível de distancia, uma vez que os indivíduos dessas populações não apresentam grau de parentesco significativo. Acredita-se que a prática de cabrucagem que ocorreu nessas áreas no passado, removendo os indivíduos próximos, tenha resultado na ausência de EGE observada para essas populações.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. (2007). Conservation and the Genetics of Populations. 1st edition. *Blackwell Publishing*, Oxford,UK. 642p.

AMORIM, A.M., THOMAS, W.W., CARVALHO, A.M.V. & JARDIM, J.G. (2008) Floristic of the Una Biological Reserve, Bahia, Brazil. In *The Atlantic Coastal Forests of Northeastern Brazil* (W.W. Thomas, ed.). *Mem. New York Bot. Gard.* 100:67-146.

AZEVEDO, V.C.R.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; GRATTAPAGLIA, D. (2007) Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a heavily logged amazonian timber species. *Journal of Heredity*, v. 98, p. 646–654.

BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. (2007) Pollen movement and spatial genetic structure in a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. *Conservation Genetics*, Arlington, v. 9, p. 855-868.

BIZOUX, J.-P.; DAÏNOU, K.; BOURLAND, N.; HARDY, O.J.; HEUERTZ, M.; MAHY, G.; DOUCET, J.-L. (2009) Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in a low-density wind-pollinated tropical tree. *Molecular Ecology* 18, 4398–4408.

BIZOUX, J.-P.; DAÏNOU, K.; BOURLAND, N.; HARDY O.J.; HEUERTZ, M.; MAHY, G.; DOUCET, J.-L. (2009) Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in a low density wind pollinated tropical tree. *Mol Ecol* 18: 4398–4408.

BOTREL, M.C.G.; SOUZA, A.M.; CARVALHO, D.; PINTO, S.I.C.; MOURA, M. C.O.; ESTOPA, R.A. (2006) Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. *R. Árvore*, Viçosa-MG, v. 30, n.5, p.821 – 827.

CHUNG, M.G.; CHUNG, M.Y.; SOO, OH. G.; EPPERSON, B.K. (2000) Spatial genetic structure in a *Neolitsea sericea* population (Lauraceae). *Heredity*, 85, 490–497.

- CONTE, R.; REIS, M.S.; VENCOVSKY, R. (2006) Effects of management on the genetic structure of *Euterpe edulis* Mart. populations based on microsatellites. *Scientia Forestalis*, n. 72, p. 81-88.
- CROSSA, J.; VENCOVSKY, R. (1999) Sample size and variance effective population size for genetic resources conservation. *Plant Genetic Resources Newsletter*, Roma, v.119, p.15-25.
- CROW, J. F.; 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*, v.81, p.6073-6077.
- DEBOUT, G.D.G.; DOUCET, J-L; HARDY, O.J. (2011) Population history and gene dispersal inferred from spatial genetic structure of a Central African timber tree, *Distemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae). *Heredity*, 106, 88–99.
- DEFAVARI, G.R.; TARAZI, R.; MORENO, M.A.; FERRAZ, E.M.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.Y. (2009) Estrutura genética espacial intrapopulacional de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne na Estação Ecológica de Itirapina, SP. *Sci. For.*, Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 089-098.
- DICK, C. W.; HARDY, O. J.; JONES, F. A.; PETIT, R. J. (2008) Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. *Tropical Plant Biology*, New York, v.1, p.20–33.
- FARIA, D.; BAUMGARTEN, J. (2007) Shade cacao plantations (*Theobroma cacao*) and bat conservation in southern Bahia, Brazil. *Biodiversity and Conservation*. 16:291–312.
- FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.S. (1981) *Conservation and evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, 327p.
- FRANKHAM, R. (2005) Genetics and extinction (review article). *Biological Conservation*, Beijing, v.126, p.131–140.



FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA (2003) Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Atlas Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 1995-2000. São Paulo, Fundação SOS Mata Atlântica. Disponível em: < <http://mtc-m12.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/jeferson/2003/06.02.07.45/doc/RelatorioAtlas.pdf>>. Acessado em 13 de dezembro de 2011.

FUTUYMA, D.J. (2002) *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*, v. 94, p. 399–406.

GONZALES, E.; HAMRICK, J.L.; SMOUSE, P.E.; TRAPNELL, D.W.; PEAKALL, R. (2010) The impact of landscape disturbance on spatial genetic structure in the guanacaste tree, *Enterolobium cyclocarpum* (Fabaceae). *Journal of Heredity*, v. 101, p. 133–143.

GOUDET, J. (2002) FSTAT (version 2.9.3.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486.

GOULART, M.F.; LEMOS-FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. (2005) Phenological Variation Within and Among Populations of *Plathymenia reticulata* in Brazilian Cerrado, the Atlantic Forest and Transitional Sites. *Annals of Botany*, v. 96, p. 445-455.

HARDY, O.J.; MAGGIA, L.; BANDO, E.; BREYNE, P.; CARON, J.; CHEVALLIER, M.H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLÉ, C.; TROISPOUX, V.; VERON, V.; DEGEN, B. (2006) Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. *Molecular Ecology*, Oxford, v.15, p.559-571.

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

HEDRICK, P.W. (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*. Lancaster v. 59, n.8, p. 1633-1638.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. (2009) Disponível em <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>

IUCN (2011) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Website [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). [Accessed 15 december 2011].

JONES FA, HAMRICK J.L.; PETERSON C.J.; SQUIERS E.R. (2006) Inferring colonization history from analyses of spatial genetic structure within populations of *Pinus strobus* and *Quercus rubra*. *Molecular Ecology*, Oxford, v.15, p.851–861.

KALINOWSKI; S.T. (2004) Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation genetics*, Arlington, v. 5, p.539-543.

KYNDT, T.; ASSOGBADJO, A.E.; HARDY, O.J.; KAKAI, R.G., SINSIN, B.; VAN DAMME, P.; GHEYSEN, G. (2009) Spatial genetic structuring of baobab (*Adansonia digitata*, Malvaceae) in the traditional agroforestry systems of West Africa. *American Journal of Botany*, 96(5): 950–957.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. (2001). Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Mol. Ecol.* 10: 1143–1152.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, St. Louis, v. 82, n. 11, p. 1420-1425.

LORENZI, H. (2000) Árvores Brasileiras. *Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Editora Plantarum, 368p, Nova Odessa – SP.

- LYNCH, M. (1996) A quantitative-genetic perspective on conservation issues. In: Avise, J; Hamrick, J. (Eds.) *Conservation genetics: case histories from nature*: New York: Chapman and Hall. p.471-501.
- MARTINI A. M. Z.; FIASCHI P.; AMORIM A. M.; PAIXÃO J. L. (2007) A hot-point within a hot-spot: a high diversity site in Brazil's Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, v.16, p.3111–3128.
- MESQUITA, C.A. (2004) *RPPN da Mata Atlântica: um olhar sobre as reservas particulares dos corredores de biodiversidade Central e da Serra do Mar*. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 48 p.
- MOORE, R. J. (1977) Index to plant chromosome number 1973-1974. *Regnum Vegetable*. 91: 1-257.
- 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. *R. Árvore*, Viçosa-MG, v.29, n.2, p.281-289.
- NOVAES, R. M. L.; LEMOS-FILHO, J.P.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. (2010) Phylogeography of *Plathymentia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology*, 19, 985–998.
- NOVAES, R.M.L.; RODRIGUES, J.G.; LOVATO, M.B. (2009) An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genetics and Molecular Research*, 8, 89–96.
- PARDINI, R.; FARIA, D.; ACCACIO, G.M.; LAPS, R.R.; MARIAMO-NETO, E.; PACIENCIA, M.L.B.; DIXO, M.; BAUMGARTEN J. (2009) The challenge of maintaining Atlantic forest biodiversity: A multi-taxa conservation assessment of specialist and generalist species in an agro-forestry mosaic in southern Bahia. *Biological Conservation*, 142, 1178–1190.

REIS, J.R.M.; FONTOURA, T. (2009) Diversidade de bromélias epífitas na Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra do Teimoso – Jussari, BA. *Biota Neotrop.*, 9(1): 073-079.

SAMBUICHI, R. H. R.; OLIVEIRA, R. M.; MARIAMO-NETO, E.; THÉVENIN, J. M. R.; JÚNIOR, C. P. J.; OLIVEIRA, R. L.; PELIÇÃO, M. C. (2008) Status de conservação de dez árvores endêmicas da Floresta Atlântica do sul da Bahia – Brasil. *Artigos Técnico-Científicos Natureza & Conservação*. vol. 6 - nº1, pp. 90-108.

SAMBUICHI, R.H.R. (2002) Fitossociologia e diversidade de espécies arbóreas em cabruca (mata Atlântica raleada sobre plantação de cacau) na região sul da Bahia, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 16(1): 89-101.

SAMBUICHI, R.H.R. (2006) Estrutura e dinâmica do componente arbóreo em área de cabruca na região cacauceira do sul da Bahia, Brasil. *Acta bot. bras.* 20(4): 943-954.

SAMBUICHI, R.H.S.; HARIDASAN, M. (2007) Recovery of species richness and conservation of native Atlantic forest trees in the cacao plantations of southern Bahia in Brazil, *Biodiversity and Conservation*, v.16, p.3681-3701.

SEBBENN, A.M.; CARVALHO, A.C.M.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, S.M.B.; GAINO, A.P.S.C.; SILVA, J.M.; JOLIVET, C.; MORAES, M.L.T. (2011) Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. *Heredity*, 106, 134–145.

SLATKIN, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v.130, p.457-462.

SOUZA, A.M.; CARVALHO, D.; VIEIRA, F.A.; NASCIMENTO, L.H.; LIMA, D.C. (2007) Estrutura genética espacial de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb. Em Mata Atlântica de galeria. *Cerne*, v. 13, nº003, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil. 239-247p.

- TARAZI, R.; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. (2009) Fine-scale spatial genetic structure and allozymic diversity in natural populations of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Conservation Genetics*, DOI 10.1007/s10592-009-9939-4.
- VEKEMANS, X.; HARDY, J. (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, Oxford, v.13, p.921-935.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, Lawrence, v.38, n.6, p.1358-1370.
- WHITLOCK, M.C. (2011)  $G_{ST}$  and D do not replace  $F_{ST}$ . *Molecular Ecology*, 20, 1083–1091.
- WRIGHT, S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, v. 28, p. 114-138.
- 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*, Lancaster, v. 19, p.95-420.
- YOUNG, A.; BOYLE, T., BROWN, T. (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, Amsterdam v.11, n.10, p.413-418.
- ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; COUTO, M.A.; MORAIS; L.K.; VENCOSKY, R. (2005) Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.40, n.10, p.975-980.

---

## CONCLUSÕES GERAIS

---

- 1) Os nove locos microssatélites utilizados para análises genéticas neste trabalho demonstraram ser eficientes em estudos de diversidade, fluxo gênico e estrutura genética espacial em populações de *P. reticulata*.
- 2) Não há diferença na diversidade genética entre as populações estudadas. Entretanto, a população conservada da RPPN Serra Bonita apresentou maior diversidade genética em termos de número de alelos e alelos exclusivos e raros.
- 3) A presença de estrutura genética espacial indica ser o padrão natural encontrado para populações da espécie, demonstrando que quanto mais próximas as árvores nas populações, maior o nível de parentesco entre elas. Porém, perturbações antrópicas como a cabrucagem, interferem desconfigurando esse padrão.
- 4) As populações geograficamente mais próximas apresentaram menor divergência genética e um maior fluxo gênico histórico. Este, por sua vez, foi suficiente para impedir a diferenciação das populações estudadas no passado, contrapondo os efeitos de deriva genética.
- 5) Através do tamanho efetivo populacional, concluiu-se que a área mínima viável para conservação ao longo prazo é de aproximadamente 503 hectares, baseada no tamanho efetivo de referência de 500 na população conservada da RPPN Serra Bonita.
- 6) A coleta de sementes para conservação *ex situ*, deve ocorrer em matrizes distantes a mais de 125 m uma da outra, de forma a evitar a amostragem de árvores aparentadas.

---

## RERERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

---

AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOCO, J. (2008). Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Mol Ecol* 17: 5177–5188.

ALGER, K. E CALDAS, M. (1996) Cacau na Bahia – Decadência e ameaça à mata atlântica. *Ciência Hoje* 117:28-35.

ALLENDORF, F.W.; LUIKART. G. (2007). Conservation and the Genetics of Populations. 1st edition. *Blackwell Publishing*, Oxford,UK. 642p.

ALMEIDA S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. (1998) Cerrado: espécies vegetais úteis. *Embrapa-CPAC*, Planaltina. xiii: 280–283.

AMORIM, A.M.; JARDIM, J.G.; Lopes, M.M.M.; Fiaschi, P.; Borges, R.A.X.; Perdiz, R.O.; THOMAS, W.W. (2009) Angiospermas em remanescentes de floresta montana no sul da Bahia, Brasil. *Biota Neotrop.*, vol. 9, no. 3.

AMORIM, A.M.; THOMAS, W.W.; CARVALHO, A.M.V.; JARDIM, J.G. (2008) Floristic of the Una Biological Reserve, Bahia, Brazil. **In** The Atlantic Coastal Forests of Northeastern Brazil (W.W. Thomas, ed.). *Mem. New York Bot. Gard.* 100:67-146.

AZEVEDO, V.C.R.; KANASHIRO,M.; CIAMPI; A.Y.; GRATTAPAGLIA, D. (2007) Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a heavily logged amazonian timber species. *Journal of Heredity*, v. 98, p. 646–654.

AZEVEDO, V.C.R.; VINSON, C.C.; CIAMPI, A.Y. (2005) Twelve microsatellite loci in *Manilkara huberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), an Amazonian timber species. *Mol Ecol Notes*. 5:13–15.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:155-165.

BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. (1990) Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology*, v. 8, p. 930-932.

BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. (2008) Pollen movement and spatial genetic structure in a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. *Conservation Genetics*, Arlington, v. 9, p. 855-868.

BORÉM, A. (2001) Escape gênico e transgênicos. Viçosa: UFV, 206 p.

BRAGA, L. L.; TOLENTINO, G.S.; SANTOS, M. R.; VELOSO, M. D.M.; NUNES, Y.R. F. Germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae-Mimosoideae) sob influência do tempo de armazenamento. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 258-260.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. (1998) Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor Appl. Genet.* 97: 816-827.

BROQUET, T.; PETIT, E. (2009). Molecular estimation of dispersal for ecology and population genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 193-216.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; SOUZA, Z.P (2003) Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites, *Circular técnica 20*, Embrapa Cenargen, Brasília DF, 11p.

CARVALHO, P.E.R. (2009) Vinhático - *Plathymenia reticulata*. Comunicado Técnico 231 (INFOTECA-E); Colombo: Embrapa Florestas, 2009. 11 p. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/578666>>. Acessado em 05 de maio de 2011.

CIAMPI, A.Y.; BRONDANI, R.; GRATTAPAGLIA, D. (2000) Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera Langsdorffii* Desf. (Copaíba)-Leguminosae-



Caesalpinioideae e Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco. *Boletim de Pesquisa*. Embrapa: n.16, p.1 – 40.

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. (1999) Development and characterization of microsatellite tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity* 83: 748-756.

CONTE, R.; REIS, M.S.; VENCOVSKY, R. (2006) Effects of management on the genetic structure of *Euterpe edulis* Mart. populations based on microsatellites. *Scientia Forestalis*, n. 72, p. 81-88.

CUNHA, R.P.P. (2006) “Exploração Madeireira”. In CAMPANILI, Maura & PROCHONOW, Miriam (Orgs). Mata Atlântica - Uma rede pela vida, Brasília RMA.

DEBOUT, G.D.G.; DOUCET, J-L; HARDY, O.J. (2011) Population history and gene dispersal inferred from spatial genetic structure of a Central African timber tree, *Distemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae). *Heredity*, 106, 88–99.

DICK, C. W.; HARDY, O. J.; JONES, F. A.; PETIT, R. J. (2008) Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. *Tropical Plant Biology*, New York, v.1, p.20–33.

DOW, B.D.; ASHLEY, M.V. (1998) High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *Journal of Heredity* 89:62-70.

EGGERS, B.; MATERN, A.; DREES, C.; EGGERS, J.; HÄRDTLE, W.; ASSMANN, T. (2010) Value of Semi-Open Corridors for Simultaneously Connecting Open and Wooded Habitats: a Case Study with Ground Beetles. *Conservation Biology* v.24, n.1, p.256-266.

EGITO, A.A.; PAIVA, S.R.; MAMANI, E.V.; ALBUQUERQUE, M.S.M *et al* . (2004) *Variabilidade Genética de raças bovinas baseada em Marcadores STR*. V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal.

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

ELLSTRAND, N.C.; ELAM, D.R. (1993) Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Palo Alto, v.24, p.217-242.

EPPERSON, B.K. (1990) Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Eds.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland: Sinauer, 1990. P.229-253.

ESTOUP, A.; JARNE, P.; CORNUET, J.M. (2002) Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11:1591-1604.

FARIA, D.; BAUMGARTEN, J. (2007) Shade cacao plantations (*Theobroma cacao*) and bat conservation in southern Bahia, Brazil. *Biodivers. Conserv.* 16:291-312.

FERNANDES, A.T.; SANTOS, A.T.F.; PIMENTA, F.C. (2005) Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Revista de Patologia Tropical*. vol. 34 (2): 113-122.

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

FRANCO, M.; HOLZ, B.; KAULE, G.; KLEYER, M.; MENEZES, M. DE; PEREIRA, J. M. E TREVISAN, S. (1994) Program of the environmental development of the rainforest region in Bahia, Brazil -development of a methodology. *Stuttgart-Hohenheim*, University of Stuttgart.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA (1993) Fundação Instituto de Pesquisas Espaciais. *Atlas da Evolução dos Remanescentes Florestais e Ecossistemas Associados do Domínio da Mata Atlântica no período 1985-1990*. São Paulo, 1993. São Paulo, Fundação SOS Mata Atlântica.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA (2003) Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. *Atlas Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 1995-2000*. São Paulo,

Fundação SOS Mata Atlântica. Disponível em: < <http://mtc-m12.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/jeferson/2003/06.02.07.45/doc/RelatorioAtlas.pdf>>. Acessado em 13 de dezembro de 2011.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA (2009) Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. *Atlas dos remanescentes florestais da mata atlântica período 2005-2008*. São Paulo, Fundação SOS Mata Atlântica. Disponível em: <[http://mapas.sosma.org.br/site\\_media/download/atlas%20mata%20atlantica-relatorio2005-2008.pdf](http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/atlas%20mata%20atlantica-relatorio2005-2008.pdf)>. Acessado em 07 de outubro de 2011.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA (2011) Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. *Atlas dos remanescentes florestais da mata atlântica período 2008-2010*. São Paulo, Fundação SOS Mata Atlântica. Disponível em: <[http://mapas.sosma.org.br/site\\_media/download/atlas\\_2008-10\\_relatorio%20final\\_versao2\\_julho2011.pdf](http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/atlas_2008-10_relatorio%20final_versao2_julho2011.pdf)>. Acessado em 10 de novembro de 2011.

FUTUYMA, D.J. (2002) *Biologia Evolutiva*. 2 ed. Ribeirão Preto: FUNPEC. 631 p.

GAIOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. (2001) Microsatellite markers for Heart of Palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Palmae). *Molecular Ecology Notes*, v. 1, n. 1, p. 86-88.

GIUDICE NETO, J.D.; KAGEYAMA, P.Y. (2000) Estrutura genética espacial em populações naturais de *Machaerium villosum* Vog. (Leguminosae) na região de Moji-Guaçu, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.23, n.2, p.207-215.

GOLDSTEIN, D.G.S.; SCHLÖTTERER, C. (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford Univ. Press, Oxford.

GOULART M.F.; LEMOS FILHO J.P.; LOVATO M.B. (2005) Phenological variation within and among populations of *Plathyenia reticulata* in Brazilian Cerrado, Atlantic Forest and transitional sites. *Ann. Bot.* 96: 445-455.

GRAMACHO, I da C. P.; MAGNO, A. E. S.; MANDARINO, E. P. e MATOS, A. (1992) *Cultivo e beneficiamento do cacau na Bahia*. Ilhéus, CEPLAC.

GUIDUGLI, M.C.; CAMPOS, T.; SOUSA, A.C.B.; FERES, J.M.; SEBBENN, A.M.; MESTRINER, M.A.; CONTEL, E.P.B.; ALZATE-MARIN, A.L. (2009) Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. *Conserv Genet*, 10:1001–1004.

HARDY, O.J.; MAGGIA, L.; BANDO, E.; BREYNE, P.; CARON, H.; CHEVALLIER, M.H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLE, C.; TROISPOUX, V.; VERON, V.; DEGEN, B. (2006) Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 15, n.2, p.559–571.

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

HEDRICK, P.W. Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology and Evolution*, Amsterdam, v.16, p.629–636, 2001.

JOHNS, N. D. (1999) Conservation in Brazil's chocolate forest: the unlikely persistence of the traditional cocoa agroecosystem. *Environmental Management* 23(1):31-47.

JONES, A.G.; ARDREN, W.R. (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 12, 2511 – 2523.

KUMAR, P.; GUPTA, V.K.; MISRA, A.K.; MODI, D.R.; PANDEY, B.K. (2009) Molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2, 141–162.

LACERDA, C.M.B.; KAGEYAMA, P.Y. (2003) Estrutura genética espacial de duas populações nativas de *Myracrodruon urundeuva* M. Alemão na região semi-árida, Brasil. *Revista Árvore*, v.27, n.2, p.145-150.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. (2002) Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymenia foliolosa* and *P. reticulata* (Mimosoideae), inferred using RAPD markers. *Plant Syst. Evol.* 235:67-77.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS-FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. (2001) Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from Brazilian Cerrado. *Mol. Ecol.* 10:1143-1152.

LEMES, M.R.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. (2002) Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis os Mahogany, *Switenia macrophyla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. *The Journal of Heredity* 93(4): 287-290.

LEMOS-FILHO, J.P.; GOULART, M.F.; LOVATO, M.B. (2008) Populational approach in ecophysiological studies: the case of *Plathymenia reticulata*, a tree from Cerrado and Atlantic Forest. *Braz. J. Plant Physiol.*, 20(3):205-216.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11 , p.2453-2465.

LINDGREN, D.; GEA, L.; JEFFERSON, P. (1996) Loss of genetic diversity monitors by status number. *Silvae Genetica*, Forstgenetik, v.45, n.1, p.52-59.

LITT, M.; LUTY, J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Amr J Hum Genet* 44: 397–401.

LOBÃO, D. E. V. P. (2007) *Agroecossistema Cacaueiro da Bahia: Cacau-cabruca e Fragmentos Florestais na Conservação de Espécies Arbóreas*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São Paulo.

LOBÃO, D. E.; SETENTA, W. C.; LOBÃO, E. S. P.; CURVELO, K.; VALLE, R. R. (2007) Cacau Cabruca – sistema agrossilvicultural tropical. In: VALLE, R. R. (Ed.). *Ciência, tecnologia e manejo do cacaueiro*. Itabuna: Gráfica e Editora Vital, p. 290-323.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. (1995). Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82:1420-1425.

LORENZI, H. (2000) Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: *Editora Plantarum*, 382p.

LYNCH, M.; WALSH, B. (1998) *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sunderland: Sinauer Associates, 980p.

MARTINI A. M. Z.; FIASCHI P.; AMORIM A. M.; PAIXÃO J. L. (2007) A hot-point within a hot-spot: a high diversity site in Brazil's Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, v.16, p.3111–3128.

MENEZES, M.P.C.; MARTINEZ, A.M.; RIBEIRO, M.N.; FILHO, E.C.P. & BERMEJO, J.V.D. (2006) Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35(4): 1336 – 1341.

MITTERMEIER, R.A.; GIL, P.R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, J.; MITTERMEIER, C.G.; LAMOURUX, J.; FONSECA, G.A.B. (2005) *Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions*. Cemex, Washington, DC.

MOORE, R. J. 1977. Index to plant chromosome number 1973-1974. *Regnum Vegetable*. 91: 1-257.

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. *R. Árvore*, Viçosa-MG, v.29, n.2, p.281-289.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J*, v.3, n.1, p.175-182.

MOURA, T.M.; SEBBENN, A.M.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; OLIVEIRA, G.C.X.; KAGEYAMA, P.Y. (2009) Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum spp.* do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. *Scientia forestalis*, 37: 143-150.

MULLIS, K.; FALOONA, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, v. 55, p. 335-350.

NAKANISHI, A.; TOMARU, N.; YOSHIMARU, H.; MANABE, T.; YAMAMOTO, S. (2008) Effects of seed- and pollen-mediated gene dispersal on genetic structure among *Quercus salicina* saplings. *Heredity*, London, v.96, p. 79-84.

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

NOVAES, R. M. L.; LEMOS-FILHO, J.P.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. (2010) Phylogeography of *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology*, 19, 985–998.

OLIVEIRA, E.J., PÁDUA, J.G., ZUCCHI, M.I., VENCOVSKY, R., VIEIRA, M.L.C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 294-307.

PARDINI R (2004) Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. *Biodivers Conserv* 13:2567–2586.

PARDINI, R., FARIA, D., ACCACIO, G.M., LAPS, R.R., MARIANO, E., PACIENCIA, M.L.B., DIXO, M. & BAUMGARTEN, (2009). The challenge of maintaining Atlantic forest biodiversity: a multi-taxa conservation assessment of specialist and generalist species in an agroforestry mosaic in southern Bahia. *Biological Conservation*, 142: 1178-1190.

POTT, A.; POTT, V. J. (1997). *Plathymenia reticulata*, Leguminosae-Mimosoideae. In: *Plants of Pantanal*, p. 155. Brasília: Brazilian Agricultural Research Corporation.

POWELL, W., MACHARAY, G.C., PROVAN, J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, v.7, p.215-222.

RASSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. (1991) Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12, 113-118.

REED, D.H. (2005) Relationship between population size and fitness. *Conservation Biology* v.19, p. 563–568.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, v.142, p.1141-1153.

SAATCHI, S.; AGOSTI, D.; ALGER, K.; DELABIE, J. E MUSINSKY, J. (2001) Examining fragmentation and loss of primary forest in the southern bahian Atlantic Forest of Brazil with radar imagery. *Conservation Biology*, 15(4):867-875.

SAMBUICHI, R. H. R. (2003) *Ecologia da vegetação arbórea de cabruca – Mata Atlântica raleada utilizada para cultivo de cacau – na região sul da Bahia*. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília. Brasília.

SAMBUICHI, R.H.R. (2002) Fitossociologia e diversidade de espécies arbóreas em cabruca (mata Atlântica raleada sobre plantação de cacau) na região sul da Bahia, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 16(1): 89-101.

SAMBUICHI, R.H.R.; MIELKE, M.S.; PEREIRA, C.E. (2009) *Nossas árvores: conservação, uso e manejo de árvores nativas no sul da Bahia*. 1ª ed. Ilhéus, BA. *Editus*, 296p.: il.; anexos.

SAMBUICHI, R.H.S.; HARIDASAN, M. (2007) Recovery of species richness and conservation of native Atlantic forest trees in the cacao plantations of southern Bahia in Brazil, *Biodiversity and Conservation*, v.16, p.3681-3701.



SCHLÖTTERER C. (2004) The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nat Rev Genet* 5:63–69.

SEBBENN, A. M.; SEOANE, C.E.S. (2005) Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. *Revista Árvore*, Viçosa, v.29, n.1, p. 1-7.

SEBBENN, A.M.; CARVALHO, A.C.M.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, S.M.B.; GAINO, A.P.S.C.; SILVA, J.M.; JOLIVET, C.; MORAES, M.L.T. (2011) Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. *Heredity*, 106, 134–145.

SEBBENN, A.M.; SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R. (2000) Effects of the management on the genetic structure of caixeta (*Tabebuia cassinoides*) populations. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n.58, p.127-143.

SILVA JÚNIOR, M.C. (2005) Cem árvores do Cerrado: guia de campo. Rede de sementes do Cerrado: Brasília.

SILVA, J.M.C.; CASTELETI, C.H.M. (2003) Status of the biodiversity of the Atlantic forest of Brazil. **In** The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook (C. Galindo-Leal & I.G. Câmara, eds.). *Center for Applied Biodiversity Science and Island Press*, Washington, p. 43-59.

SLATKIN, M. (1985) Gene flow in natural population. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.16, p.393-430.

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

SMOUSE, P.E.; SORK, V.L. (2004) Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *Forest Ecology and Management*, 197, 21–38.

STEWART, C.N., HALFHILL, M.D.; WARWICK, S.I. (2003) Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews Genetics*, 4: 806-817.

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.

TARAZI, R.; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. (2009) Fine-scale spatial genetic structure and allozymic diversity in natural populations of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Conservation Genetics*, DOI 10.1007/s10592-009-9939-4.

TAUTZ, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*, v.17, n.16, p.6463-6471.

TELLES, M.P.C.; PEIXOTO, F.P.; LIMA, J.S.; RESENDE1, L.V.; VIANELLO, R.P.; WALTER, M.E.M.T.; COLLEVATTI, R.G. Development of microsatellite markers for the endangered Neotropical tree species *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae). *Genetics and Molecular Research* 10 (1): 321-325.

TEMNYKH,S.; DECLERCK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L.; CARTINHO, S.; MCCOUCH, S. (2001) “Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential,” *Genome Research*, vol. 11, no. 8, pp. 1441–1452.

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

VIEIRA, M.V.; OLIFIERS, N.; DELCIELLOS, A.C.; ANTUNES, V.Z.; BERNARDO, L.R.; GRELE, C.E.V.; CERQUEIRA, R. (2009) Land use vs. fragment size and isolation as determinants of small mammal composition and richness in Atlantic Forest remnants. *Biological Conservation* v. 142, p. 1191–1200.

WARWICK, M.C.; LEWIS, G.P. (2003) Revision of *Plathymenia* (Leguminosae - Mimosoideae). *Edinb. J. Bot.* 60:111-119.

WEBER, J.L. (1990) Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, v.7, n.4, p.524-530.

WEBER, J.L.; MAY, P.E. (1989) Abundance class os human DNA popymorphisms which can be typed using the popymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, v.44, n.3, p.388-396.

WRIGHT, S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, Lancaster, v. 19, p.95-420.

YOUNG, A.G.; BOYLE, T.; BROWN, T. (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Tree*, Cambridge, v.11, n.10, p.413-418.

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

ZUCCHI, M.I. (2002) *Análise da estrutura genética de Eugenia dysenterica DC utilizando marcadores RAPD e SSR*. Tese (doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, Universidade de São Paulo – USP, 130p.