

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



**Avaliação do modelo paleoclimático de refúgios da Floresta Atlântica  
utilizando ferramentas genéticas em uma espécie arbórea**

**DANIELA BITENCOURT BORGES**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**FEVEREIRO DE 2014**

**DANIELA BITENCOURT BORGES**

**Avaliação do modelo paleoclimático de refúgios da Floresta Atlântica  
utilizando ferramentas genéticas em uma espécie arbórea**

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 2014**

B732

Borges, Daniela Bitencourt.

Avaliação do modelo paleoclimático de refúgios da Floresta Atlântica utilizando ferramentas genéticas em uma espécie arbórea / Daniela Bitencourt Borges. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.

xv, 53f. : Il.

Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto.

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

Inclui referências.

1. Genética de populações. 2. Microssatélites (Genética). 3. Florestas tropicais - Conservação. 4. Biodiversidade florestal. 5. Melanoxylon braúna. I. Título.

CDD 576.58

**DANIELA BITENCOURT BORGES**

Avaliação do modelo paleoclimático de refúgios da Floresta Atlântica  
utilizando ferramentas genéticas em uma espécie arbórea

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: 17 de fevereiro de 2014

Prof. Dr. Cássio van den Berg  
(UEFS)

Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio  
(UESC)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janisete Silva Miller  
(UESC)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Amato Gaiotto  
(UESC – orientadora)

“Da minha aldeia vejo quanto da terra se pode ver do Universo  
Por isso a minha aldeia é grande como outra qualquer  
Porque eu sou do tamanho do que vejo  
E não do tamanho da minha altura...”

Alberto Caeiro  
(*O Guardador de Rebanhos*)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pela infraestrutura;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela contribuição na minha formação;

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e financiamento do projeto;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo financiamento do projeto;

À Rede Sisbiota Leguminosas, pelo financiamento do projeto; ao coordenador Prof. Dr. Luciano Paganucci de Queiroz e à secretária Mariana Calazans pela ajuda na organização das coletas e por estarem sempre dispostos a responder questões sobre a prestação de contas;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Amato Gaiotto, por ser uma excelente professora, pesquisadora ética e mãe dedicada, por investir seu tempo, paciência e experiência na formação dos seus alunos e orientados; por ter me dado essa oportunidade, por ter acreditado em mim e apoiado meu projeto com as braúnas;

Ao Eduardo Mariano, que como co-orientador me auxiliou no delineamento amostral, na confecção dos mapas e me acompanhou em todas as coletas; e como companheiro foi compreensivo, apoiou minhas decisões, me incentivou sempre a melhorar como pessoa e como pesquisadora;

Aos professores do PPGGBM pelos ensinamentos, em especial ao Prof. Dr. Roberto Tarazi, com quem aprendi a utilizar a maioria dos programas estatísticos usados nessa dissertação;

Às secretárias do programa, Mara, Fabrícia e Kátia por sempre resolverem nossos problemas;

Ao técnico Horlei pela paciência, dedicação e por estar sempre disponível para genotipar minhas amostras;

Aos amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares e do Grupo de Pesquisa, Dani França, Flora, Caio, Rodrigo, Acássia, Alesandro, Polliana, pelas conversas, companhia, por serem sempre tão prestativos e por me cederem horários no termociclador;

Aos colegas e amigos Gonçalo, Cláudio, Paty, Rebeca e Monique pelas conversas de corredor;

À Manu e Paulinho por serem minha família durante esses dois anos;

Ao Ramires por ter me emprestado seu precioso estilingue (algum dia eu devolvo);

Aos amigos Caio e Márcio por terem me acompanhado na primeira expedição de coleta;

À RPPN Estação Veracel, em especial à Lígia, por todo apoio que possibilitou a coleta em Porto Seguro, pela recepção e infraestrutura;

Ao Instituto Terra, em especial ao Jaeder, por ter possibilitado a coleta em Aimorés – MG;

Ao Incaper, em especial ao Hugo pelo suporte e ao Dimas e ao tecnólogo (Galego) que nos acompanharam e possibilitaram nossa coleta em São Roque do Canaã – ES;

Ao Mosteiro Zen Morro da Vargem, por ter possibilitado a coleta em Ibiraçu- ES, especialmente ao Monge Daiju pelas conversas, suco de tangerina e ensinamentos;

A João Eduardo, também conhecido como João das orquídeas, por ter nos acompanhado na coleta em Itapebi – BA;

À RPPN Feliciano Abdala por ter concedido autorização de coleta em Caratinga – MG

Ao Sr. Raul por ter possibilitado a coleta em Amargosa – BA e ao auxiliar de campo Cheira-cheira por ter nos acompanhado;

À empresa Café Norte por ter possibilitado a coleta em sua reserva legal em Itabela -BA

À empresa Couvre por ter possibilitado a coleta em sua reserva legal em Prado - BA

À Secretaria de Meio Ambiente de Potiraguá e à Associação Agrovila em Potiraguá por terem possibilitado as coletas neste município;

À minha família pelo apoio, amor e compreensão;

Minha mãe que sempre se preocupou com as viagens de campo, meu pai por ter me ajudado na procura das braúnas, Vó Solange pela revisão ortográfica;

A bisavó Conceição, pelas palavras de apoio mesmo não entendendo nadinha do que eu faço;

Meus irmãos Peu e Paulinho, pelo amor;

Vó Lúcia, Vô Paulo e Raeder que se preocuparam com minha nutrição mandando deliciosos pratos de Jequié;

Os tios e tias, Andréa, Tchuck, João, Julie, Juca, Irlane, Cica, Rick, Tiago e Perla os primos e primas, Tatai, Bruna, Rafa, João e Márcio por torcerem por mim;

As minhas pequenas Malu (não tão pequena) Valentina e Analua, priminhas queridas que me fazem muito feliz;

A todos aqueles que mesmo não citados contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!



# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	v
EXTRATO .....	x
ABSTRACT .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiv
LISTA DE TABELAS .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
Mata Atlântica e histórico biogeográfico:.....	4
Refúgios do Pleistoceno: .....	5
<i>Melanoxylon brauna</i> .....	6
Marcadores Microssatélites (SSRs):.....	8
Diversidade genética.....	10
3. CAPÍTULO 1 .....	12
4. CAPÍTULO 2.....	17
INTRODUÇÃO .....	18
METODOLOGIA .....	21
Delineamento amostral.....	21
Extração e quantificação de DNA .....	24
Amplificação dos locos SSR.....	24
Genotipagem .....	24
Análise de dados.....	25
RESULTADOS .....	28
Comparação da diversidade genética entre refúgio e não refúgio .....	28
Estrutura genética.....	30
Agrupamento.....	34
Análise Molecular de Variância.....	35
DISCUSSÃO .....	36
Diversidade genética .....	36
Endogamia.....	38
Estrutura genética e agrupamento .....	39
Implicações para conservação .....	41
REFERÊNCIAS.....	43

5. CONCLUSÕES GERAIS .....	47
6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES .....	48

## **EXTRATO**

Borges, Daniela Bitencourt; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – BA, fevereiro de 2014. **Avaliação do modelo paleoclimático de refúgios da Mata Atlântica utilizando ferramentas genéticas.** Orientadora: Dr<sup>a</sup> Fernanda Amato Gaiotto. Co-orientador: Dr. Eduardo Mariano Neto

A hipótese dos refúgios florestais da Mata Atlântica defende que, durante os muitos ciclos glaciais, as florestas retraíram-se em áreas menores que permaneceram florestadas durante as glaciações. Se essas áreas de estabilidade realmente existiram, as populações dependentes de floresta ficaram restritas a esses fragmentos nos períodos de glaciação, expandindo sua distribuição com o avanço da floresta nos períodos de ótimos climáticos. Por efeito fundador, apenas parte da variabilidade genética atingiria as áreas que não foram refúgio. Assim, acredita-se que os refúgios concentrem maior diversidade genética que as áreas recentemente colonizadas. Se esta diferença de variabilidade genética existe, as populações presentes nos refúgios propostos para Mata Atlântica também teriam populações potencialmente mais resilientes às perturbações antrópicas. Esta é uma informação importante para orientar políticas de gestão da diversidade, especialmente risco de extinção associado à redução de habitat. De acordo com o modelo de refúgios proposto, os padrões genéticos decorrentes dos efeitos de retração e expansão das áreas florestadas poderiam ser mensurados nas populações atuais por meio de ferramentas moleculares, como os marcadores microssatélites. O modelo biológico utilizado neste trabalho foi *Melanoxylon brauna*, uma espécie arbórea madeireira, endêmica da Floresta Tropical Atlântica, que se encontra ameaçada pela fragmentação e corte seletivo. Assim, os objetivos desse estudo foram: (i) desenvolver primers microssatélites específicos para *Melanoxylon brauna* e (ii) estudar a diversidade e estrutura genética de populações naturais da espécie em locais que se encontram dentro e fora de refúgios florestais pleistocênicos propostos por simulações paleoclimáticas. Dessa forma, o presente trabalho foi dividido em duas partes: o capítulo 1 trata do desenvolvimento, através do sequenciamento de última geração (NGS), e caracterização de 38 marcadores microssatélites inéditos, polimórficos e específicos para a espécie; no capítulo 2, dezessete dos marcadores desenvolvidos foram utilizados como ferramenta molecular para avaliar se existe diferença na estrutura e diversidade genética e composição alélica de sete populações localizadas nos propostos refúgios e seis populações localizadas em áreas previstas como fora de refúgios. Os resultados aqui expostos podem ajudar na compreensão sobre a existência e limites dos

refúgios florestais e auxiliar a elaboração de estratégias de conservação para a Mata Atlântica que levem em conta os efeitos genéticos do histórico paleoclimático e biogeográfico.

## **ABSTRACT**

Borges, Daniela Bitencourt; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – BA, February, 2014. **Evaluation of paleoclimate model for Atlantic Forest refugia using molecular tools.** Advisor: Dr<sup>a</sup> Fernanda Amato Gaiotto. Co-advisor: Dr. Eduardo Mariano Neto

According to the hypothesis of forest refugia in the Atlantic Forest, during many glacial cycles, certain forest areas were reduced but remained forested during glaciations. If these areas of stability have really existed, forest-dependent populations were restricted to those fragments during glacial periods and then expanded their distribution in further forest areas in times of climatic stability. Due to the founder effect, only part of the genetic variability could have reached non-refugia areas. Therefore, it is believed that the highest genetic diversity is concentrated in refugia, when compared to recently colonized areas. If such a genetic variability difference does exist, the refugia areas would presumably include populations and communities more resilient to anthropogenic disturbances. This information is essential to formulate management policies for conservation, especially in areas where the risk of extinction is associated with habitat reduction. According to the refugia model proposed, genetic patterns resulting from the effects of retraction and expansion of forested areas could be assessed in current populations with molecular markers, such as microsatellites. *Melanoxylon brauna* was used as a biological model in this study. It is a hardwood tree species endemic to the Atlantic Rainforest, which is endangered due to fragmentation and selective logging. The aims of our study were to (i) develop microsatellite primers specific to *Melanoxylon brauna* and (ii) study the diversity and genetic structure of natural populations in areas located inside and outside boundaries of Pleistocene refugia proposed by paleoclimatic simulations. Therefore, this study was divided into two parts: chapter 1 focuses on the simple sequence repeats (SSR) development using next-generation sequencing (NGS) and characterization of 38 unpublished microsatellite primer pairs, which were polymorphic and specific for this tree species; chapter 2 reports the use of 17 of those developed markers to assess differences in the genetic diversity and allelic composition of seven populations from areas of proposed refugia and six from areas predicted as non-refugia. The results discussed here will help in understanding the existence and limits of forest refugia and assist in developing conservation strategies for the Atlantic Forest, taking into account the genetic effects of the paleoclimatic and biogeographic history.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: <i>Melanoxylon brauna</i> A. Cerca feita de madeira de brauna; B. Árvore adulta encontrada no município de Amargosa, Bahia; C. e D. Inflorescência. ....	8
Figura 2: Mapa dos pontos de coleta de <i>M. brauna</i> . Os refúgios são mostrados em verde e os não refúgios em vermelho. Os círculos e as siglas indicam os pontos onde as amostras foram coletadas e as referências das localidades. ....	22
Figura 3: Resultado da análise utilizando o software Structure Harvester para sugerir o melhor valor de K para os indivíduos de <i>Melanoxylon brauna</i> . ....	31
Figura 4: Relações genéticas em 13 populações de <i>Melanoxylon brauna</i> (384 indivíduos) estimadas utilizando programa Structure baseado em marcadores microssatélites. O gráfico A (K = 2) mostra o arranjo mais provável, baseado no valor de $\Delta K$ segundo método de Evano. Os gráficos B e C (K=3 e K=10) mostram outras possibilidades de agrupamento com maiores valores de $\Delta K$ . ....	32
Figura 5: À esquerda, pontos de coleta de <i>M. brauna</i> . Os refúgios são mostrados em verde e os não refúgios em vermelho. Os círculos e as siglas indicam os pontos onde as amostras foram coletadas e as referências das localidades. À direita dendrograma representando as distâncias genéticas de Nei (1987) entre populações. A confiabilidade de cada nó foi estimada a partir de 1000 bootstraps. ....	34
Figura 6: Partição da variação genética pela Análise Molecular de Variância. Em verde a variação atribuída a diferenças dentro das populações, em vermelho entre populações e em azul, entre regiões. ....	35

## LISTA DE TABELAS

Table 1. Description of 43 microsatellite loci developed for <i>Melanoxylon brauna</i> . For each primer, the repeat motif, forward and reverse sequence, annealing temperature ( $T_a$ ), allele range, and GenBank accession number.....	15
Tabela 2: Municípios onde foram coletadas amostras de <i>Melanoxylon brauna</i> , Estado, código, data de coleta, coordenadas geográficas e número amostral, entre parêntesis os adultos.....	23
Tabela 3: Diversidade genética e índice de fixação de 13 populações de <i>Melanoxylon brauna</i> . A= número de alelos; A <sub>ex</sub> = alelos exclusivos; A <sub>e</sub> = alelos efetivos; I = índice de diversidade de Shannon; H <sub>o</sub> = heterozigosidade observada; H <sub>e</sub> = heterozigosidade esperada; F= índice de fixação e IC = intervalo de confiança.....	28
Tabela 4: Medidas de diversidade genética de <i>Melanoxylon brauna</i> comparando “refúgio” e “não refúgio”. A= número de alelos; A <sub>ex</sub> = número de alelos exclusivos; A <sub>e</sub> = alelos efetivos; I = índice de diversidade de Shannon; H <sub>o</sub> = heterozigosidade observada; H <sub>e</sub> = heterozigosidade esperada e n = número amostral.....	29
Tabela 5: Valores de estrutura genética com base no $F_{ST}$ par a par para as 13 populações de <i>Melanoxylon brauna</i> .....	33



# 1. INTRODUÇÃO

O Domínio da Mata Atlântica abrangia originalmente 13% do território nacional, estando presente em 17 estados brasileiros (IBGE, 2004), porém, em decorrência da fragmentação, hoje ocupa apenas 11 % da sua cobertura original (RIBEIRO et al., 2009). Devido à ação antrópica, perda de cobertura vegetal e alta taxa de endemismo é considerada como área prioritária para a conservação, sendo um dos 25 hotspots de biodiversidade conhecidos no mundo (MYERS, et al., 2000).

Estudos realizados na Mata Atlântica têm apontado para uma sensibilidade acentuada de espécies arbóreas a processos de fragmentação e exploração madeireira levando a mudanças profundas nestas comunidades com perda de espécies importantes, especialmente aquelas longevas (PARDINI et al., 2009; LOPES et al., 2009). As espécies arbóreas madeireiras ainda sofrem com a exploração e corte seletivo. A partir da década de 70 e intensificando-se na década de 90, a exploração madeireira no sul da Bahia e nordeste de Minas Gerais foi mais severa sobre as populações de algumas espécies como o jacarandá (*Dalbergia nigra*), pequi preto (*Caryocar edule*), braúna (*Melanoxylon brauna*), maçaranduba (*Manilkara maxima*, *M. salzmanii* e *M. multifida*) e outras (MESQUITA, 1997).

Endêmica da Mata Atlântica, *Melanoxylon brauna* vem sendo intensamente explorada para o aproveitamento de sua madeira. É uma árvore longeva e de crescimento lento, sua madeira é muito dura e de alta densidade, considerada madeira de lei e, por isso, tão valorizada. Devido à fragmentação da Mata Atlântica e corte seletivo, *M. brauna* é considerada como vulnerável na lista de espécies ameaçadas do IBAMA (2014).

A exploração desordenada dessas e outras espécies da Mata Atlântica pode levar a uma redução da variabilidade genética das populações e, conseqüentemente, do seu potencial para responder a flutuações no ambiente. Esta situação agrava-se na medida em que os indivíduos, muitas vezes, encontram-se isolados em populações pequenas e em fragmentos de florestas desconectados, podendo levar à redução de alelos e da heterozigose (FARWIG et al., 2008), depressão endogâmica, e perda de diversidade por deriva genética (PIERCE, 2004; FREELAND e PETERSEN, 2011). As análises genéticas e de viabilidade populacional, que estudam as respostas das populações à

redução de hábitat e fragmentação, normalmente desconsideram a influência do histórico evolutivo recente. Contudo, os eventos de reduções populacionais por mudanças climáticas pretéritas podem influenciar diretamente as respostas das espécies às alterações de habitat atuais por alterar capacidades de permanência e evolução (NOGUÉS-BRAVO et al., 2010).

Durante as mudanças climáticas do Pleistoceno, muitas espécies mudaram ou reduziram sua distribuição geográfica, adaptaram-se a elas ou extinguiram-se (LAWING e POLLY, 2011). As mudanças que ocorreram na vegetação e na distribuição de espécies têm sido consideradas como um importante fator para a diferenciação genética em níveis populacionais (BEHLING e LICHTER, 1997; PRANCE, 2002). Muitos trabalhos vêm sendo feitos no sentido de avaliar o impacto dessas mudanças pretéritas na biota atual, seja na diversidade genética ou haplotípica, seja na distribuição ou riqueza de espécies. (BEHLING e LICHTER, 1997; CADENA et al., 2012; CARNAVAL et al., 2009; NOGUÉS-BRAVO, 2009; PAULS et al., 2013).

Um importante modelo paleoclimático, que propôs a localização da Mata Atlântica durante o último máximo glacial (UMG) do Pleistoceno, foi o modelo de Carnaval e Moritz (2008), que sugeriu três áreas estáveis para manutenção do bioma no passado: em Pernambuco, na Bahia e em São Paulo, áreas essas que também foram chamadas de refúgios. A existência e localização de tais refúgios ainda é controversa, porém, se tais oscilações climáticas realmente existiram, as consequências genéticas podem ser medidas nas populações atuais através dos marcadores moleculares. Essas consequências são: (i) maior diversidade genética nas populações de áreas estáveis (refúgios), em relação às áreas instáveis (não refúgios) devido ao longo tempo de permanência; (ii) assinaturas de expansão populacional em áreas instáveis, refletindo a colonização recente; (iii) ausência de padrões de isolamento por distância nas áreas recentemente colonizadas, visto que a colonização foi muito recente para permitir o reestabelecimento do equilíbrio migração/deriva; (iv) forte estrutura filogeográfica entre refúgios (CARNAVAL et al., 2009).

O uso de ferramentas genéticas na investigação das retrações e expansões florestais tem ajudado a validar áreas de estabilidade para diversos grupos (CABANNE et al., 2008; CARNAVAL et al., 2009; FITZPATRICK et al., 2009; THOMÉ et al., 2010; VALDEZ e D'ELÍA, 2013). As sequências mitocondriais, cloroplastidiais e nucleares são muito empregadas nos estudos sobre o impacto das mudanças climáticas pretéritas na biota. No entanto, a desvantagem no uso dessas sequências para elucidar

questões evolutivas é que podem refletir a evolução da região de DNA e não do organismo (RICHARD e THORPE, 2001).

Os marcadores microssatélites são multialélicos, co-dominantes e altamente variáveis. Sua vantagem em relação às sequências é que abrange muitos pontos e estão bem distribuídos pelo genoma. Sua limitação é que devido a sua alta taxa de mutação ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  por geração) (KASHI e KING, 2006), podem não ser adequados para avaliar o histórico evolutivo de espécies com ciclos de vida curtos. Porém, para espécies longevas, como é o caso de espécies arbóreas, esta ferramenta tem se mostrado extremamente útil para análises populacionais e evolutivas (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, 2006).

Os microssatélites foram aqui empregados com objetivo de comparar a diversidade genética de populações de *M. brauna* que se encontram dentro e fora de refúgios florestais pleistocênicos propostos por simulações paleoclimáticas (CARNAVAL e MORITZ, 2008). Especificamente, pretendeu-se (i) Desenvolver e caracterizar locos SSR específicos, inéditos e polimórficos para a espécie *M. brauna*; (ii) Avaliar a possível presença de alelos exclusivos nas populações de refúgio. (iii) Avaliar o efeito da estruturação genética entre áreas propostas como refúgios e não refúgios.

Hipotetiza-se que as populações de *M. brauna* coletadas em áreas previstas como refúgios tenham maior diversidade genética em relação àquelas coletadas em áreas instáveis ou não refúgios.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### **Mata Atlântica e histórico biogeográfico:**

A Mata Atlântica corresponde a um dos maiores conjuntos de florestas tropicais da América do Sul, e ocupava originalmente uma área de quase 1.500.000 km<sup>2</sup> no Brasil. Apesar de sua redução histórica, apresenta ainda cerca de 20.000 espécies de plantas e 1.361 espécies conhecidas de vertebrados, que corresponde de 1 a 8% do total de espécies do planeta (SILVA e CASTELLETTI 2003; MYERS et al., 2000). A ação antrópica associada à expansão agropecuária tende a isolar as áreas de floresta remanescentes imersas em paisagens dominadas por pastagens, plantações e áreas urbanas. Por conta da severa redução e isolamento, associada a uma alta diversidade e endemismos, a Mata Atlântica brasileira é considerada uma das 25 áreas prioritárias para a conservação no mundo, apontada como um “hotspot” (MYERS et al., 2000).

Por se distribuir em uma enorme faixa na porção litorânea do Brasil, a Mata Atlântica cobre uma variação muito grande de solos, topografias e climas, com uma biota diferenciada, que pode ser subdividida em regiões biogeográficas (SILVA e CASTELLETTI, 2003). A região biogeográfica da Mata Atlântica conhecida como Bahia compreende as florestas úmidas desde a região central do Estado do Espírito Santo até o sul de Sergipe. Apesar da intensa modificação a que foi submetida, a região sul da Bahia (GALINDO-LEAL e CÂMARA 2003), ainda apresenta a maior concentração de remanescentes florestais do nordeste brasileiro e a segunda maior do Brasil (RIBEIRO et al., 2009), compondo também, um dos três bolsões de endemismo para borboletas, anfíbios, aves, mamíferos e plantas (FARIA et al., 2007).

O estudo de como os processos ecológicos pretéritos ou atuais influenciaram a distribuição de organismos e padrões de endemismo na Mata Atlântica é uma importante vertente da biogeografia.

Dentro desta área destaca-se o estudo de modelos climáticos para propor hipóteses alternativas sobre a estrutura da população no passado (NOGUÉS-BRAVO, 2009). Estes modelos estão sendo amplamente utilizados para esclarecer questões evolutivas como extinção de espécies (MARTÍNEZ-MEYER et al., 2004; NOGUÉS-BRAVO, et al., 2008), mecanismos de especiação (PETERSON e NYÁRI, 2008, SOLOMON et al., 2008), localização de refúgios do Pleistoceno (CARNAVAL e MORITZ, 2008), e

hotspots (CARNAVAL et al., 2009). O estudo genético voltado para compreensão do histórico biogeográfico é essencial para o entendimento do histórico microevolutivo e da possibilidade de persistência das espécies em longo prazo (AGUILAR et al., 2008).

Pesquisas recentes sobre os modelos de refúgios apontam para maior diversidade genética nas populações localizadas nas áreas que foram previstas como refúgios florestais no Pleistoceno (CARNAVAL et al., 2009; FITZPATRICK et al., 2009). Essa maior diversidade pode permitir que estas populações tenham respostas adaptativas diferenciadas em relação às alterações ambientais. Assim, acredita-se que as populações que habitam as áreas de Mata Atlântica que permaneceram florestadas no passado tenham maior capacidade de responder às alterações ambientais atuais decorrentes das ações antrópicas, como a fragmentação dos habitats e redução da cobertura vegetal. Assim, estudos sobre o histórico biogeográfico da Mata Atlântica, especialmente sobre a localização e existência dessas áreas de estabilidade, ou refúgios, podem ajudar a delinear áreas prioritárias para a conservação e auxiliar na gestão e manejo de paisagens.

### **Refúgios do Pleistoceno:**

Durante o pleistoceno as geleiras continentais avançaram e recuaram resultando em inúmeras mudanças ambientais, como, por exemplo, a configuração e extensão dos habitats, mudanças nas zonas climáticas e alterações na formação e dissolução das rotas de migração. Em contrapartida essas mudanças levaram a algumas alterações na dinâmica biogeográfica das espécies que, desde o Mesozoico, estavam adaptadas a climas estáveis e homogêneos. De acordo com a teoria dos refúgios florestais (HAFFER, 1969), essas oscilações climáticas pretéritas que alteraram a distribuição de animais e plantas têm implicações nos padrões atuais de diversidade (BROWN e LOMOLINO, 2006). Dessa forma, as florestas tropicais atuais são um mosaico de áreas que sempre foram florestadas e áreas instáveis que voltaram a ser florestadas após perturbações causadas durante um ou mais períodos glaciais (BENNETT e PROVAN, 2008).

Segundo essa teoria, o isolamento espacial entre os refúgios florestais teria agido como uma barreira para dispersão de alguns organismos, o que pode ter interrompido o fluxo gênico entre populações de espécies com distribuição limitadas às áreas de

refúgio, e, portanto, pode ter promovido especiação por vicariância (HAFFER, 2008). A hipótese de refúgios florestais tropicais tem sido largamente utilizada na explicação de padrões de diferenciação genética de animais e plantas e de padrões atuais de distribuição das espécies (CARNAVAL et al., 2009; FITZPATRICK et al., 2009).

Os padrões de diferenciações genéticas podem ser mensurados nas populações atuais, pois as consequências genéticas que as glaciações causaram nos animais e plantas podem ser detectadas por meio de ferramentas moleculares. A principal consequência foi a manutenção de uma maior diversidade genética nas populações que habitaram áreas de refúgios em relação às áreas que não foram refúgios, devido ao longo tempo de permanência das populações nessas condições até a volta do ambiente completamente florestado. Outra consequência é a forte estrutura filogeográfica entre os refúgios, já que permaneceram desconectados por muito tempo. Além disso, as populações que se expandiram em áreas de não refúgio, apresentam assinaturas genéticas dessa expansão populacional que refletem a colonização pelos refúgios adjacentes. Essas decorrências dos refúgios vêm sendo cada vez mais corroboradas, podendo auxiliar na definição de estratégias de gestão de paisagens com vistas à conservação da biodiversidade na Mata Atlântica.

### ***Melanoxylon brauna***

A *Melanoxylon brauna* uma árvore de grande porte pertencente à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae. Fabaceae é uma das famílias de plantas mais diversas do mundo, com aproximadamente 19.325 espécies (LEWIS et al., 2005) e é a segunda família mais diversa da floresta Atlântica, com 939 espécie neste bioma.

A braúna é endêmica da Mata Atlântica brasileira e ocorre na Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, em áreas de Floresta Estacional Semidecidual, das Terras Baixas e Submontana; Floresta Estacional Semidecidual Baixo-Montana (OLIVEIRA-FILHO, 2006) e Floresta Ombrófila (MARIANO-NETO, 2004).

É classificada como vulnerável na Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção (IBAMA, 2014). Por ser uma madeira nobre e alcançar alto preço no mercado, foi muito explorada para comercialização (GONZAGA, 2006). Foi uma das principais madeiras utilizadas pelas serralherias no sul da Bahia (MESQUITA, 1997) sendo intensamente

explorada para confecção de móveis de luxo, estacas, moirões, postes, e instrumentos musicais (LORENZI, 1992).

Floresce anualmente com duração intermitente entre fevereiro e maio (ENGEL e MARTINS, 2005). Foi observado, pela equipe desse trabalho em campo, florescimento em abril de 2013, entretanto não foi observado no mesmo período no ano de 2012 em nenhuma das localidades visitadas. Ainda não há estudos sobre a polinização dessa espécie, mas constatou-se em campo a presença de abelhas, como *Apis* e *Xylocopa* visitando as flores. A maturação dos frutos ocorre de agosto a novembro (CARVALHO, 1994).

É caracterizada por Rizzini, (1971) como uma árvore com cerca de 15 a 20 metros de altura e tronco de 40-80 cm de diâmetro. Foram observadas, contudo, por nossa equipe braúnas com cerca de 40 metros de altura e pelo menos 1 metro de diâmetro.

As folhas são compostas, imparipinadas, alternas, com 15-29 folíolos opostos e glabros, lanceolado-ovados, assimétricos (RIZZINI, 1971), ápice de acuminado a cuspidado, base obtusa, consistência membranácea, margem íntegra, comprimento 6,0 a 7,5cm, largura 2,0 a 3,5cm, nervação peninérvea, nervuras secundárias unidas entre si, formando uma série de arcos marginais proeminentes, nervuras planas na face superior e proeminente na face inferior, vênulas conspícuas em ambas as faces reticuladas, ausência de pelos, peciólulo canaliculado sob lente, mais espesso que a nervura principal, rugoso e glabro, com 0,3 a 0,4cm de comprimento (GARAY e RIZZINI, 2003). Possui ainda flores amarelas, em panículas terminais amplas, fruto legume deiscente, contendo várias sementes duras envoltas por estrutura membranácea (asa) (BARROSO et al., 1999). Sua madeira, classificada como de lei, é muito pesada (densidade 1,05 g/cm<sup>3</sup>), compacta, dura ao corte e de grande durabilidade mesmo quando em ambientes adversos (LORENZI, 1992).



Figura 1: *Melanoxylon brauna* A. Cerca feita de madeira de brauna; B. Árvore adulta encontrada no município de Amargosa, Bahia; C. e D. Inflorescência.

### Marcadores Microsatélites:

Os genomas de todos os organismos conhecidos possuem regiões de sequência repetida (CHAMBERS e MACAVOY, 2000), sendo que no genoma dos eucariotos essas regiões são abundantes. Existem regiões mais complexas como os minissatélites e mais simples como os microsatélites, também chamados SSRs (Sequências Simples Repetidas). Os SSRs que são sequências de DNA curtas de 2 a 6 nucleotídeos repetidos de 5 a 50 vezes em tandem (LITT e LUTY, 1989), são multialélicos e têm expressão codominante.

Podem ser classificados pelo tamanho do motivo de repetição como mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeo e pelo tipo da repetição como (i) microsatélites perfeitos, em que não há interrupção no motivo de repetição, (ii) imperfeitos, que apresentam outra sequência além do motivo de repetição; (iii) interrompidos, em que há inserção de



algumas bases que não são a sequência repetida e (iv) compostos, que possuem mais de um motivo de repetição (GOLDSTEIN e SCHLOTTERER, 1999).

Um alelo microssatélite é determinado pelo seu tamanho em pares de bases, e o polimorfismo se dá por mutações que alteram o tamanho da região repetida pelo aumento ou subtração de um ou mais motivos de repetição.

As mutações em microssatélites podem ocorrer por dois processos principais, o primeiro devido a um erro na replicação do DNA, conhecido com *slipage* ou escorregamento da DNA polimerase que resulta em erro de pareamento durante a replicação (VIGUERA, 2001). O segundo devido ao crossing-over desigual das fitas de DNA durante a meiose. Segundo Harding et al., (1992), a presença de regiões repetidas aumentam a chance de ocorrer alinhamento desigual durante a recombinação, levando a mudanças no tamanho da sequência microssatélite.

Os marcadores SSR possuem taxa de mutação de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  nucleotídeos por geração, que é considerada alta quando comparada com genes codificantes (LI et al., 2002). Devido ao seu elevado conteúdo de informação por loco, os microssatélites têm sido largamente utilizados em estudos de genética de populações (MORIN et al., 2009; RESENDE, et al., 2011; PANDEY et al., 2013), evolução (KASHI e KING, 2006; DLUGOSCH e PARKER, 2008) e estudos de filogenia e filogeografia (RICHARD e THORPE, 2001; RICHARD e THORPE, 2001 COLLEVATTI, 2003; ALDENHOVEN et al., 2010).

Existem dois modelos mutacionais que são principalmente empregados para explicar o surgimento de novos alelos, o modelo de alelos infinitos (IAM – *Infinite Allele Model*; KIMURA e CROW, 1964) e o modelo de mutação por passos (SMM – *Stepwise Mutation Model*; KIMURA e OHTA, 1978). O primeiro considera que as mutações sempre originam um alelo novo através do acréscimo ou decréscimo de uma ou mais unidades de repetição e que as mutações sempre geram um alelo novo na população. O segundo pressupõe que um alelo só pode ser originado pela deleção ou inserção de apenas um motivo de repetição, dependendo, assim do estado alélico anterior. Desde que foi concebido, o modelo SMM tem sido amplamente usado para modelar a evolução dos locos microssatélites.

Um grande obstáculo para a utilização dos marcadores microssatélites em organismos não modelo é o alto custo e intensa mão de obra envolvida no isolamento de um número considerável de sequências flanqueadoras dessas regiões genômicas que serão utilizadas como iniciadores (*primers*) (SCHOEBEL et al., 2013).

Tradicionalmente era necessário isolar sequências de DNA da espécie em questão, selecionar clones positivos e sequenciar através do método de Sanger, et al., (1977).

Com a chegada das plataformas de sequenciamento de última geração (NGS), o desenvolvimento de iniciadores que amplifiquem regiões microssatélites tornou-se mais viável. Dentre as plataformas NGS, a mais utilizada na identificação de microssatélites é o pirosequenciamento 454 da Roche (ZALAPA et al., 2012; SCHOEBEL et al., 2013). A principal vantagem do NGS é que a etapa de clonagem e seleção de clones positivos não é mais necessária e a etapa de enriquecimento de biblioteca genômica é opcional. Além disso, esta plataforma é a que gera fragmentos sequenciados de maior tamanho (até 400 pares de base), evitando, assim a necessidade de tratamento bioinformático dos dados para montagem de fragmentos grandes o suficiente para possibilitar o desenho de *primers*.

### **Diversidade genética**

A biodiversidade abrange todos os níveis de variação da vida, diversidade entre biomas, entre ecossistemas, entre espécies, populações e ente indivíduos. A diversidade genética é definida como a heterogeneidade de alelos e genótipos de um grupo, matéria prima sobre a qual a seleção natural pode atuar, permitindo a evolução dos organismos e adaptação a ambientes heterogêneos, presença de parasitas e mudanças ambientais (FRANKHAM, 2005).

Os índices de diversidade genética mais comumente mensurados são: heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada, número de alelos por loco, número efetivo de alelos por loco, alelos exclusivos e índice de fixação.

Os fatores evolutivos que atuam sobre a diversidade genética são: deriva genética, mutação, seleção natural e migração. A deriva genética ocorre principalmente em populações pequenas e trata-se da oscilação das frequências alélicas de geração a geração devido a eventos estocásticos. A mutação insere alelos ao acaso nas populações, devido a erros que ocorrem durante a duplicação do DNA. A migração insere novos alelos nas populações através de alelos já existentes em outras populações. A seleção natural consiste na reprodução diferencial dos genótipos e age diminuindo a diversidade genética (FUTUYAMA, 2009).

A maioria das espécies arbóreas sofreram gargalos genéticos em diferentes tempos, em um momento mais recente devido a fragmentação e exploração, e em um

momento mais antigo devido aos períodos glaciais e recolonizações (MÜLLER-STARCK et al., 2005). O conhecimento sobre a distribuição e quantificação da diversidade genética nas populações remanescentes dessas espécies pode ajudar a propor hipóteses acerca dos processos históricos que influenciaram os padrões observados atualmente. Esse conhecimento também é extremamente importante para orientar políticas de conservação e manejo da biodiversidade.

### 3. CAPÍTULO 1

#### **Development of microsatellite primers for *Melanoxylon brauna* (Fabaceae): An endangered tree endemic from Brazilian Atlantic Forest**

Capítulo publicado na revista Conservation Genetics Resources: Development of microsatellite primers for *Melanoxylon brauna* (Fabaceae): An endangered tree endemic from Brazilian Atlantic Forest

Daniela B. Borges<sup>1</sup>; Eduardo Mariano Neto<sup>2</sup>; Fernanda A. Gaiotto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética, Centro de Biotecnologia e Genética, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC); <sup>2</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

## Development of microsatellite primers for *Melanoxylon brauna* (Fabaceae): an endangered and endemic tree from the Brazilian Atlantic Forest

Daniela B. Borges · Eduardo Mariano-Neto ·  
Fernanda A. Gaiotto

Received: 15 July 2014 / Accepted: 29 July 2014  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

**Abstract** Using next-generation sequencing, we developed and characterized microsatellite primers for *Melanoxylon brauna*, an important timber species endemic to the Atlantic forest. To characterize the primers, 32 young trees were sampled at one population. Of the 48 primers designed, 43 showed positive amplification and 38 were polymorphic. The combined probability of paternity exclusion was higher than 0.999, and the identity index was lower than 0.001, indicating that the microsatellite primers were suitable for various molecular studies such as paternity testing, gene flow, population structure, and evolution. We believe that the application of this tool in the biological model will contribute to the information on the history of the Atlantic forest, as well as improve strategies and conservation measures for this Brazilian diversity hotspot.

**Keywords** Next-generation sequencing · Atlantic forest · SSR · Conservation genetics · Endangered species

The tree species *Melanoxylon brauna*, popularly known as “braúna”, belongs to the Fabaceae family, subfamily

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s12686-014-0288-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. B. Borges · F. A. Gaiotto (✉)  
Laboratório de Marcadores Moleculares, Centro de  
Biotecnologia e Genética, Universidade Estadual de Santa Cruz  
(UESC), Rodovia Jorge Amado km 16, Ilhéus, BA 45662-900,  
Brazil  
e-mail: gaiotto@uesc.br

E. Mariano-Neto  
Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade  
Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil

Caesalpinoideae. It is an endemic Atlantic forest tree that can reach a height of 40 m and occurs from Bahia to Sao Paulo in seasonal forests and rainforests. Its wood is of high density, dark, durable, and highly valuable. Based on these superior characteristics, this species was widely exploited and it is currently included in the Official List of Threatened Flora of Brazil (IBAMA 2008). To study population structure at the molecular level, we developed 43 species-specific microsatellite primers by next generation sequencing (NGS) (454 pyrosequencing technology, Ecogenics GmbH, Schlieren, Switzerland).

To construct the genomic library, DNA was extracted from fresh leaves of *M. brauna* collected in Lençóis, Bahia, Brazil (12°27'53" S, 41°18'38" W) using the protocol described by Borges et al. (2012). The library was constructed using DNA enriched with (AC)<sub>n</sub> and (GA)<sub>n</sub> probes. Primers were tested on 32 trees, sampled from Una, Bahia, Brazil (15°20'33" S, 39°02'10" W).

Forty-eight primers pairs were designed and synthesized, although five did not amplify. The remaining 43 primers showed amplification patterns in electrophoretic agarose gel analysis and thirty-eight were polymorphic.

Polymerase chain reaction (PCR) was carried out using a 13 µL reaction mixture consisting of 7.5 ng of genomic DNA, 1.3 µL of 10X buffer, 3.25 mM of each dNTP, 3.6 µg bovine serum albumin (BSA), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U of *Taq* DNA polymerase (Phonetrria, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), 3.9 mM of reverse primer, 3.9 mM of forward primer with an M13 tail (CACGACGTTGTTAAAACGA) added to its 5' end, and 1.43 mM fluorochrome-labeled primer that was complementary to the M13 tail (6-FAM, VIC, PET, or NED, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The PCR reaction consisted of an initial denaturation step at 94 °C for 1 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 56 °C for 45 s, 72 °C for 1 min, followed by 8 cycles

**Table 1** Genetic characterization of 43 microsatellite loci developed for *Melanoxylon brauna*

Locus	GenBank ID	Repeat motif	Primer sequence 5'-3'	Allele size range (bp)	<i>N<sub>a</sub></i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>Q</i>	<i>I</i>	EHW
Mbra01	KJ842126	(TG) <sub>16</sub>	F: ACTgggTgTgTgCgATTg R: CgTAGCggTTgTAGATgAgTg	117–153	7	0.875	0.715	0.679	0.125	*
Mbra02	KJ842127	(AG) <sub>11</sub>	F: AgCgggTTgTTgCAGATTTTC R: CCTCggCTTgCATATCgAAC	118–150	5	0.625	0.56	0.395	0.296	***
Mbra03	KJ843245	(AC) <sub>16</sub>	F: TgATTTTTgCCACggAggAg R: TACTCTggTCggCAACTCAC	118–148	10	0.611	0.737	0.708	0.113	ns
Mbra04	KJ843246	(AC) <sub>18</sub>	F: CACAgtTATgCgAAAACATTCATTC R: AAgTTgTggTgCgATgTTTg	122–188	5	0.24	0.565	0.535	0.23	***
Mbra05	KJ843247	(TG) <sub>12</sub>	F: gTAGAAgCCTgCTgTTCCAAg R: CCCATTgCACAAgTgACTgC	144–164	5	0.241	0.225	0.213	0.615	ns
Mbra06	KJ843248	(GT) <sub>16</sub>	F: CggCTATCAAATTTTACACTCACg R: CgTCACTTACTCCAAGTgCAC	110–180	12	0.586	0.777	0.764	0.085	**
Mbra07	KJ843249	(GT) <sub>12</sub>	F: CgAAgggACCAGAAATCTCCC R: AAggggAggAggCTAACAAG	176–200	4	0.156	0.302	0.26	0.517	***
Mbra08	KJ843250	(GC) <sub>11</sub>	F: TgggCAAggTgTgTACgg R: ggCCgAgAggTgATgC	133–169	3	0.063	0.062	0.06	0.883	ns
Mbra09	KJ843251	(AC) <sub>11</sub>	F: ggAAgACTTTgATgCggTgAg R: AAgCCTTTgggATACCTgTg	225–255	3	0.567	0.575	0.433	0.265	ns
Mbra10	KJ843252	(AC) <sub>12</sub>	F: CCATgCCAATgAggTCAAgg R: TAggCCCTTTgTTAgCCTC	182–250	16	0.844	0.715	0.75	0.105	ns
Mbra11	KJ843253	(GA) <sub>19</sub>	F: gCCCACCACAAACTTgTCTC R: TATCATCACTCCgCCTTCC	128	1	–	–	–	–	–
Mbra12	KJ843254	(TG) <sub>11</sub>	F: ggTCAgCTCAAAAaggTCCATC R: TTgTATgCATggCAAgTACg	135	1	–	–	–	–	–
Mbra14	KJ843255	(AC) <sub>11</sub>	F: TgATTCTCAggTTCCTTACAgC R: TCggAATCTTCTgCATCAgg	190	1	–	–	–	–	–
Mbra15	KJ843256	(AC) <sub>12</sub>	F: AgTTCgATTCCCCgTCAgAg R: gCTTCTggAggTTgTCATgg	106–122	2	0.031	0.031	0.03	0.94	ns
Mbra16	KJ843257	(AC) <sub>13</sub>	F: CAgATgAAgCATCgCCTACg R: CTgTTCgTAACCTTCCCgTgC	116–168	4	0.094	0.092	0.09	0.828	ns
Mbra17	KJ843258	(CA) <sub>12</sub>	F: gCTCAgATTTAgAgATCAACTCCC R: CACgTgAAACCgTATgTAgCC	168–172	3	0.281	0.364	0.289	0.451	ns
Mbra18	KJ843259	(TC) <sub>12</sub>	F: TTATAgggTgATgCCACCTg R: gTCAAATTCgTCCTCTggC	200–276	4	0.6	0.822	0.665	0.116	*
Mbra19	KJ843260	(CA) <sub>17</sub>	F: ggATgTgggAgTCATgggAg R: ggATgTgggAgTCATgggAg	122	1	–	–	–	–	–
Mbra20	KJ843261	(CA) <sub>12</sub>	F: ATggAACACCAgggAgCAg R: gTgCCAgCTCAACCTgTAAg	162–182	3	0.667	0.555	0.425	0.276	ns
Mbra21	KJ843262	(TG) <sub>14</sub>	F: CTCAAggAAATTTgAATgCTTgC R: TggCTTTgTTgTTATCCTTgg	196–240	6	0.813	0.726	0.639	0.133	ns
Mbra22	KJ843263	(CA) <sub>11</sub>	F: AgAACgTTgCCTCATCTCTg R: AgggACgTTAATTggggTgg	110–158	16	0.625	0.707	0.756	0.105	ns
Mbra23	KJ843264	(TG) <sub>11</sub>	F: gCTgCAggTgCACgTTATAC R: gATTACAgACgACACgACgC	116–124	4	0.719	0.705	0.583	0.156	ns
Mbra25	KJ843265	(TG) <sub>11</sub>	F: ggCTgCCCCTAgTTCATTTg R: gCAgCCgTAAggTTTgTCTC	176–212	6	0.656	0.671	0.597	0.167	ns
Mbra26	KJ843266	(TG) <sub>16</sub>	F: CCCTTCCATCCAAgATCgC R: CCATTAgAgCTATgCCATgTg	112–150	8	0.391	0.703	0.679	0.13	**

**Table 1** continued

Locus	GenBank ID	Repeat motif	Primer sequence 5'-3'	Allele size range (bp)	<i>N<sub>a</sub></i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>Q</i>	<i>I</i>	EHW
Mbra27	KJ843267	(GGT) <sub>8</sub>	F: AggATAggCATggATCATggAg R: AggCAAATTCTAgCACCAgC	180	1	–	–	–	–	–
Mbra29	KJ843268	(TG) <sub>14</sub>	F: TgCATggACTTTCCTCAAgC R: AgCAATAAATTTggTCgCgg	154–176	2	0.563	0.411	0.25	0.437	*
Mbra30	KJ843269	(AG) <sub>14</sub>	F: ACATgCgggTTCTgTATTTTATAgg R: CACATTCTggCACgTgTCTC	124–148	3	0.656	0.514	0.332	0.344	ns
Mbra31	KJ843270	(TG) <sub>11</sub>	F: gCATAggCagggTTTTTggg R: ACCCATgACCTgTAAgCCTC	172–204	11	1	0.803	0.787	0.073	ns
Mbra32	KJ843271	(AG) <sub>14</sub>	F: TgCACACTAACCTCCTTCC R: CCgTTgCTTCTgACCACTC	124–158	5	0.375	0.531	0.475	0.268	ns
Mbra33	KJ843272	(AC) <sub>21</sub>	F: ggAATCTAAAATACATTAaggAAgTgg R: TAggCACACCTATgCTCTCg	122–180	14	0.333	0.814	0.844	0.056	***
Mbra34	KJ843273	(CA) <sub>13</sub>	F: CCTTCCATgTgCAACgTCC R: AgggAAAAgAATCggCAgg	214–244	4	0.607	0.693	0.564	0.167	ns
Mbra35	KJ843274	(AG) <sub>12</sub>	F: TCAGCTgCATACTAgAAAAC R: TgATgCAGgCAATTCACAg	132–184	5	0.719	0.64	0.53	0.205	ns
Mbra37	KJ843275	(GT) <sub>11</sub>	F: AgCAATgTTgCATACTgAgC R: CgCCTTCATCCATACTACC	240–260	4	0.5	0.586	0.456	0.255	*
Mbra38	KJ843276	(CG) <sub>12</sub>	F: TCAATCACCAATTgCTTCTTC R: AgTggCgTACTgCTCTCTTC	156–220	10	0.219	0.749	0.728	0.102	***
Mbra39	KJ843277	(TG) <sub>12</sub>	F: AACTgggAAACATgCACAg R: CCTCTAgTTgCCACATgCAg	214–282	4	0.133	0.251	0.233	0.584	*
Mbra40	KJ843278	(TG) <sub>12</sub>	F: AAATACACAAGCCACgCCTC R: gACCCACCAgTgTATCCgAC	174–200	5	0.656	0.673	0.622	0.155	ns
Mbra41	KJ843279	(TG) <sub>14</sub>	F: AgCCATAgAggCCATTgTTg R: TCTTgATCATCTCCTCCAgC	206–264	6	0.406	0.427	0.415	0.356	ns
Mbra43	KJ843280	(TG) <sub>12</sub>	F: gAAAACACCAgCTgCAC R: gCACCTgTTggATCAACTCC	206–238	4	0.406	0.481	0.39	0.329	ns
Mbra44	KJ843281	(CA) <sub>20</sub>	F: CCATgCCAAAATCATCACAC R: TTgTgCCTAgAggTgAgTgg	202–256	10	0.889	0.779	0.79	0.077	ns
Mbra45	KJ843282	(AC) <sub>11</sub>	F: AgTTCAgACCTCTggCCTC R: TCTgggAAAgtTgACAggTg	179–193	3	0.5	0.419	0.277	0.418	ns
Mbra46	KJ843283	(AC) <sub>13</sub>	F: AgAggCATCAAAGCTCCAAg R: AgAATgACTTCTCCgCCA	132–178	11	0.714	0.889	0.901	0.029	***
Mbra47	KJ843284	(AC) <sub>13</sub>	F: CgTTTgAAgCCAAAATggAg R: TCAgggTACACATCTgTgAAAAAC	222–296	12	0.774	0.7	0.707	0.122	***
Mbra48	KJ843285	(AG) <sub>20</sub>	F: CAACTCTgAACTCAATgTgTgTg R: TTACgTgTTgTTgTgCgTCC	152–208	8	0.969	0.758	0.743	0.095	ns
Mean	–	–	–	–	5.976	0.529	0.571	–	–	–

(*N<sub>a</sub>*) Number of alleles, (*H<sub>o</sub>*) observed heterozygosity, (*H<sub>e</sub>*) expected heterozygosity, (*Q*) probability of paternity exclusion, (*i*) identity index, (HWE) Hardy–Weinberg equilibrium

ns = not significant, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

for annealing of the M13 tail at 94 °C for 1 min, 53 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, followed by a final extension step at 72 °C for 10 min.

The amplified fragments were subjected to capillary electrophoresis on an ABI 3500 Genetic Analyzer multi-load system (Applied Biosystems). The peaks were

analyzed using the Gene Mapper software version 4.1 (Applied Biosystems). The primer sequences, GenBank accession numbers and type of repetitive pattern are described in Table 1. Analysis of the number of alleles per locus ( $N_a$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ), probability of paternity exclusion ( $Q$ ) and identity index ( $i$ ) were performed using CERVUS 3.0.3 software package (Kalinowski et al. 2007). Analysis of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) were performed using GDA (Lewis and Zaykin 2001) and analysis of linkage disequilibrium (LD) were performed using Genepop 4.2 (Rousset 2008), and their values are also shown in Table 1.

$H_o$  values ranged from 0.031 to 1.00, and  $H_e$  ranged from 0.031 to 0.889. The combined probability of paternity exclusion ( $Q$ ) and identity index ( $i$ ) for the 38 polymorphic loci was 0.99999 and  $5.8 \times 10^{-27}$ , respectively, which indicate that these molecular tools are useful in paternity testing and other population analysis of accuracy. We detected linkage disequilibrium (LD) in Mbra01, Mbra02, Mbra03, Mbra04, Mbra05, Mbra07, Mbra20, Mbra30, Mbra35, Mbra38, Mbra43, Mbra44, Mbra45, Mbra46 and Mbra47 likely due to selection or genetic drift on sampled population.

The microsatellite markers we developed can also be widely used in conservation, population, and landscape genetics, molecular ecology, evolution, gene flow, and population structure studies. Thus, this molecular tool will contribute to developing conservation strategies and projects for Atlantic Forest, specifically for conservation of *M.*

*brauna* and other important phylogenetically related species.

**Acknowledgments** The authors thank to Horlei Ribeiro for technical support. This work was funded by SISBIOTA – CNPq/Fapesb (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) #PES0051/2011 and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) #48703/2012-5. We also thank to CNPq for scholarships to DBB and FAG.

## References

- Borges DB, Amorim MB, Waldschmidt AM, Mariano-Neto E, Vivas CV, Pereira DG (2012) Optimization of DNA extraction from fresh leaf tissues of *Melanoxylon brauna* (Fabaceae). *Genet Mol Res* 11:1586–1591
- IBAMA (2008). Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção. IBAMA, Brasil. <http://www.ibama.gov.br/documentos/lista-de-especies-ameacadas-de-extincao>. Accessed 13 Jan 2014
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099–1106
- Lewis PO, Zaykin D (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.ceb.uconn.edu/lewishome/software.html>. Accessed 10 June 2014
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8:103–106



## 4. CAPÍTULO 2

***Melanoxylon brauna* como modelo para testar hipótese de refúgios da  
Floresta Atlântica**

## INTRODUÇÃO

Durante o Pleistoceno, ocorreram muitos ciclos glaciais e interglaciais e as implicações de tais oscilações para a biota têm sido foco de estudos em todo o mundo (AVISE e WALKER, 1998; BENNETT e PROVAN, 2008; TOLLEFSRUD et al., 2008; CEBALLOS, 2010). Nas regiões temperadas, muitas evidências que dão suporte a hipótese de que os biomas florestados se contraíram para próximo do equador durante os períodos glaciais (PETIT et al., 2002; WALKER et al., 2009; ALDENHOVEN et al., 2010). O termo “refúgio” foi inicialmente aplicado para indicar um fragmento com tamanho suficiente para sustentar uma população durante um ciclo glacial (HAFFER, 1969; STEWART et al., 2009). Na região Neotropical, entretanto, a localização, função e até mesmo existência de tais refúgios florestais glaciais têm sido bastante discutidas (BENNETT et al., 2012; KNAPP e MALLETT, 2003). A ideia de um refúgio tropical foi inicialmente proposta por Haffer, (1969) para tentar explicar os padrões de megadiversidade da Floresta Amazônica, porém esse conceito também tem sido foco de diversos estudos recentes na Floresta Tropical Atlântica (CARNAVAL e MORITZ, 2008; CARNAVAL et al., 2009; MARTINS, 2011; THOMÉ et al., 2010; PORTO et al., 2013; AMARAL et al., 2013).

Através de modelagens climáticas, Carnaval e Moritz (2008) geraram hipóteses sobre a distribuição da Mata Atlântica no passado com base em dados de precipitação anual, precipitação do trimestre mais úmido e do mais seco, média anual de temperatura, temperatura média do trimestre mais quente e mais frio, e assim, previram a localização da Mata Atlântica para três cenários: atual, 6000 e 21000 anos atrás. Através da sobreposição dos três cenários previstos por dois algoritmos; o MAXENT e o BIOCLIM, eles identificaram regiões da Mata Atlântica com alta probabilidade de terem permanecido florestadas durante o último máximo glacial (21 mil anos atrás), e essas regiões foram chamadas de refúgios. Os refúgios propostos foram validados pelos autores pela localização atual da Mata Atlântica, e por dados já publicados de registros de sítios paleopalinológicos. Os autores também procuraram validar esse modelo usando dados de DNA mitocondrial em 5 espécies de vertebrados, no entanto esses dados foram apenas parcialmente congruentes, pois as espécies preguiça (*Bradypus variegatus*), cuíca (*Metachirus nudicaldatus*) e lagarto (*Gymnodactylus darwini*)

responderam ao modelo, apresentando maior diversidade genética no hipotético refúgio da Bahia, no entanto as espécies de roedores (*Marmosops incanus* e *Phyllomys pattoni*) apresentaram maior diversidade genética ao sul do refúgio Bahia, em uma área prevista como não refúgio.

Acredita-se que áreas que permaneceram florestadas durante o último máximo glacial possuam, nos dias atuais, maior diversidade genética do que regiões que foram colonizadas depois desse período. Esta hipótese baseia-se em aspectos clássicos da genética populacional, como por exemplo, a teoria do efeito fundador, em que poucos indivíduos colonizam um habitat vazio, fazendo com que a região colonizada possua menor diversidade que a região que cedeu os propágulos colonizadores. A previsão de refúgios da Mata Atlântica de Carnaval e Moritz (2008) foi posteriormente corroborada por dados moleculares de três espécies de anfíbios que mostraram maior diversidade haplotípica nas áreas consideradas refúgios (CARNAVAL et al., 2009) e por evidências de expansão populacional de anfíbios dos supostos refúgios para áreas de não refúgio (FITZPATRICK et al., 2009). Outros trabalhos, porém, não confirmam a localização destes refúgios, como por exemplo, Thomé et al., (2010) que encontrou assinaturas de expansão populacional em anfíbios, complexo de espécies *Rhinella crucifer*, contrárias à esperada pela previsão de Carnaval e Moritz (2008). Espécies com características ecológicas contrastantes (relacionadas com tolerância a períodos secos, preferência por tipos de solos, capacidade de dispersão e região de ocorrência) podem responder de maneiras diferentes ao histórico climático, diminuindo o poder preditivo do modelo. (BROWN e LOMOLINO, 2006).

Apesar das sequências plastidiais e mitocondriais serem bastante usadas para entender como as espécies ou populações da mesma espécie se relacionaram no passado (RICHARD e THORPE, 2001; KNOWLES e RICHARDS, 2005; MARTINS et al., 2009), os marcadores microssatélites e outros marcadores nucleares multilocus, também são apropriados para acessar a informação genética e responder perguntas sobre o histórico biogeográfico e sobre mudanças climáticas. (RICHARD e THORPE, 2001; ZAKHAROV e HELLMANN, 2008; AMARAL et al., 2013). A hipótese de refúgios florestais da Mata atlântica tem sido bastante estudada, corroborada ou refutada em animais, principalmente anfíbios.

Grande parte da discussão sobre refúgios da Mata Atlântica giram em torno de estudos com vertebrados, pois é a categoria taxonômica mais estudada nesse sentido, com 89% dos trabalhos publicados em filogeografia na América do Sul (TURCHETO-

ZOLET et al., 2013). Entre os poucos trabalhos desenvolvidos com plantas neste sentido estão alguns estudos com marcadores dominantes em Araceae (*Monstera adansonii*, *Anthurium sinuatum* e *Anthurium pentaphyllum*) (ANDRADE et al., 2007; ANDRADE et al., 2009), e estudos de filogeografia em Orchidaceae (*Epidendrum denticulatum*) (PINHEIRO et al., 2013) e Fabaceae (*Dalbergia nigra* e *Plathymenia reticulata*) (NOVAES et al., 2010; RIBEIRO, et al., 2011) que tem usado a teoria dos refúgios para explicar os padrões de estrutura e diversidade encontrados. Trabalhos com outros grupos taxonômicos menos estudados, como plantas, com diferentes comportamentos e mecanismos de dispersão são de extrema importância para prever cenários não enviesados da evolução da biota na Mata Atlântica e na América do Sul.

*Melanoxylon brauna* é uma árvore endêmica da Mata Atlântica e extremamente ameaçada pela redução de habitat e corte seletivo. Foi escolhida como modelo para esse trabalho, pois em um estudo com marcadores dominantes ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), comparando duas populações, a população que foi coletada em área prevista como refúgio, mesmo em fragmento pequeno e antropizado, apresentou maior diversidade genética que outra população coletada em um grande fragmento, sem histórico recente de retirada de madeira, porém em área prevista como não refúgio (BORGES, 2011), o que deu a ideia de que essa espécie responderia bem ao modelo. Assim, o objetivo desse trabalho foi comparar a diversidade genética, composição alélica e similaridade entre populações de *M. brauna*, coletadas em áreas com alta e baixa probabilidade de terem permanecido florestadas durante as mudanças climáticas do pleistoceno tardio, utilizando 17 marcadores SSR previamente desenvolvidos para essa espécie.

## METODOLOGIA

### **Delineamento amostral**

Foram consideradas como “refúgios” áreas do modelo de simulação paleoclimática de Carnaval e Moritz (2008) que apresentaram probabilidade entre 60 a 100% de terem permanecido como floresta nos dois intervalos (21 e 6 mil anos atrás) e “não refúgio” áreas com probabilidade menor que 40% de terem permanecido com floresta nos dois intervalos, usando a definição mais restritiva de Mata Atlântica.

Foram construídos mapas das áreas de refúgio e não refúgio, contendo a divisão política dos estados e os fragmentos de Mata Atlântica, com o auxílio do programa Diva-Gis 7.5 (HIJMANS et al., 2001). Para as expedições de coleta foram selecionadas áreas de alta ou baixa probabilidade de ter permanecido florestada e que contivessem atualmente remanescentes florestais. Autorização para as diversas coletas foram obtidas de órgãos ambientais, secretarias de meio ambiente e agricultura e proprietários rurais e empresas dos municípios selecionados.

A amostragem foi feita em transecto e as plantas localizadas foram coletadas com podão, estilingue ou tesoura de poda. As coordenadas geográficas de cada indivíduo foram anotadas, assim como observações de campo, como altura da planta, se estava cortada, presença de flores ou frutos. Foram coletadas amostras foliares de jovens e adultos de *Melanoxylon brauna* em 13 localidades, no estado da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais, sendo que 7 pontos de coleta em áreas de refúgio e 6 em áreas de não refúgio. A definição de “adulto” surgiu *a posteriori*, com a análise da altura dos indivíduos amostrados que efetivamente apresentaram flores, neste caso foram considerados adultos as árvores com mais de 20m de altura. Em florestas úmidas nenhuma árvore com flores tinha menos de 25m, em florestas estacionais decíduais (Maracás, BA) foram observadas árvores floridas com 20m, porém troncos grossos (diâmetro acima de 70cm). As únicas exceções foram 3 indivíduos que eram rebrotos de grandes árvores cortadas em Aimorés, também em região de florestas estacionais. Estas árvores floriram em fustes com 15 metros de altura, porém, mesmo nesta região, as demais árvores floridas tinham mais de 20m de altura. Assim a definição considerou indivíduos que provavelmente nunca reproduziram como adultos.

Os municípios, estados e coordenadas geográficas das localidades estão descritos na Tabela 2, assim como o número de plantas amostradas em cada uma das localidades. A localização dos pontos de coleta no mapa é exibido na Figura 2.

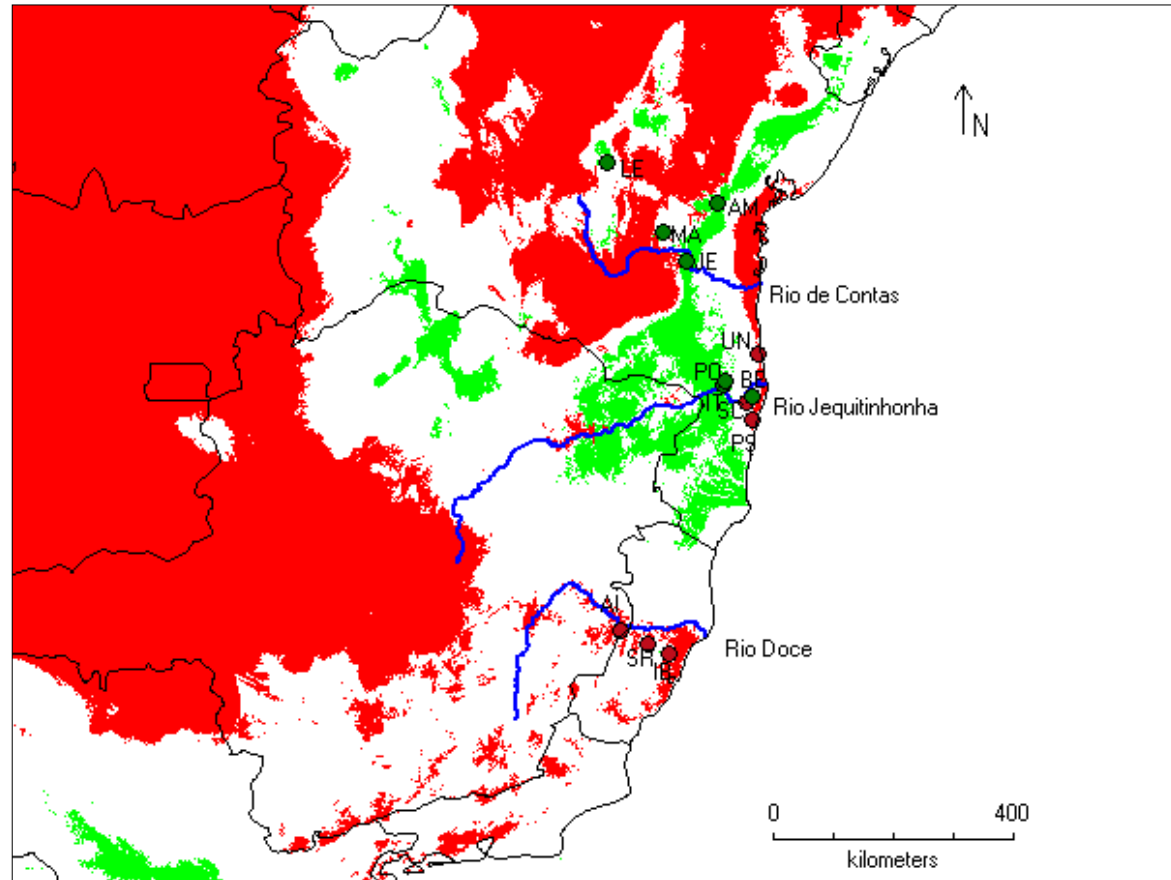


Figura 2: Mapa dos pontos de coleta de *M. brauna*. Os refúgios são mostrados em verde e os não refúgios em vermelho. Os círculos e as siglas indicam os pontos onde as amostras foram coletadas e as referências das localidades.

Tabela 2: Descrição dos pontos de coleta e amostras de *Melanoxylon brauna*.

Localidade	Estado	Código	Refúgio	Data da coleta	Coordenadas	Número amostral *
Lençóis	BA	LE	Sim	11 a 13/10/2012	12S 27' 53" 41W 18' 38"	14 (2)
Amargosa	BA	AM	Sim	21/07/2012	13S 04' 25" 39W 38' 25"	32 (4)
Maracás	BA	MA	Sim	19/07/2012	13S 31' 31" 40W 26' 46"	32 (2)
Jequié	BA	JE	Sim	18/07/2012	13S 56' 51" 40W 06' 39"	32 (0)
Itapebi	BA	IT	Sim	15/01/2013	15S 49' 34" 39W 32' 31"	32 (1)
Potiraguá	BA	PO	Sim	17/09/2013	15S 45' 37" 39W 31' 56"	33 (2)
Belmonte	BA	BE	Sim	16 a 17/01/2013	16S 00' 09" 39W 06' 30"	30 (0)
Una	BA	UN	Não	12/02/2013	15S 20' 33" 39W 02' 10"	32 (1)
Santa Cruz	BA	SC	Não	16/01/2013	16S 04' 49" 39W 12' 44"	32 (0)
Porto Seguro	BA	PS	Não	13 a 14/01/2013	16S 20' 15" 39W 07' 42"	34 (1)
Ibiraçu	ES	IB	Não	12 a 13/04/2013	19S 53' 13" 40W 22' 46"	16 (0)
São Roque	ES	SR	Não	11/04/2013	19S 44' 47" 40W 41' 45"	32 (3)
Aimorés	MG	AI	Não	15/04/2013	19S 31' 59" 41W 06' 07"	33 (6)

\*Número de adultos indicados entre parênteses. Indivíduo adulto foi considerado tendo altura superior a 20m.

## **Extração e quantificação de DNA**

As amostras foliares coletadas foram acondicionadas em sacolas plásticas e encaminhadas para o laboratório de Marcadores Moleculares da UESC, onde foram estocadas em geladeira (até cinco dias) ou freezer a -20°.

O DNA genômico total das amostras foi extraído conforme Borges et al., (2012). A concentração e qualidade do DNA foram estimadas por comparação com concentração conhecida de DNA do fago  $\lambda$  após eletroforese em agarose 1%. As amostras foram coradas antes da corrida com 2  $\mu$ l GelGreen™ diluído a 0,2% e visualizadas em transiluminador com lâmpadas de LED azul (470nm). O DNA foi diluído em água Milli-Q estéril para concentração de uso de 2,5 ng/  $\mu$ l.

## **Amplificação dos locos SSR**

Para cada reação de PCR foi preparado um mix de 13  $\mu$ l contendo 7,5 ng de DNA genômico, 1,3  $\mu$ l de tampão 10x, 3,25 mM de cada dNTP, 3,6  $\mu$ g de BSA, 20mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de taq DNA Polimerase, 3,9 mM do primer reverse, 3,9 mM do primer forward acrescido da cauda M13 (CACGACGTTGTAAAACGA) e 1,43 mM de primer com sequência complementar a cauda M13 e marcado com fluorocromo (6-FAM, VIC, PET ou NED). O termociclador foi programado para um passo inicial de desnaturação a 94°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 94° por 1 min, 56° por 45 s, 72° por 1 min, mais 8 ciclos para anelamento da cauda M13 de 94° por 1 min, 53° por 1 min, 72° por 1 min, seguido da extensão final a 72°C por 10 min.

## **Genotipagem**

As reações de amplificação foram preparadas separadamente para cada loco e a eletroforese capilar foi realizada em sistema *multiload*. Para isso foram montados dois painéis hexaplex e um painel pentaplex englobando 17 locos desenvolvidos por Borges et al., (2014). Os locos utilizados nesse estudo foram escolhidos dentre os 39 desenvolvidos de forma que o tamanho do *amplicon* possibilitasse a montagem dos



painéis *multiload* e também por terem maior número de alelos. Foram combinados até dois locos para cada fluorocromo, de forma que não houvesse sobreposição do tamanho do amplicon. Assim, cinco a seis locos foram analisados simultaneamente em uma corrida, reduzindo os custos e tempo envolvidos. Três tipos de fluorocromos foram empregados, 6-FAM, VIC e NED, sendo que o fluorocromo PET não foi utilizado, pois não apresentou boa resolução em testes iniciais, resultando em falhas de genotipagem. Para montagem do painel, cada poço da placa de genotipagem recebeu 2 µl da mistura do produto da PCR de cinco a seis locos amplificados de um indivíduo, acrescidos de 7,8 µl de formamida HiDi e 0,2 µl do marcador de tamanho padrão LIZ-500. A placa foi desnaturada em termociclador a 94° por 3 minutos e em seguida disposta em gelo por 3 minutos para choque térmico. A eletroforese para análise de fragmento foi realizada no analisador genético ABI 3500 (Life Technologies) e os picos referentes aos tamanhos dos alelos foram analisados pelo software Gene Mapper versão 4.1 (Life Technologies). Todos os picos foram interpretados e corrigidos manualmente quando necessário.

## **Análise de dados**

### **Diversidade genética e índice de fixação**

O número de alelos por loco ( $A$ ), alelos exclusivos ( $A_{ex}$ ) foram obtidos por simples contagem com auxílio do suplemento GenAlEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012); foram considerados alelos exclusivos apenas aqueles com frequência maior que 1% na população. O número efetivo de alelos por loco ( $\hat{A}_e = \frac{1}{1-H_e}$ , NEI, 1987); índice de diversidade de Shannon ( $I = -1 \times \sum(pi \times \ln(pi))$ ), onde  $pi$  é a frequência em que cada alelo aparece e  $\ln$  é o logaritmo neperiano; a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ); heterozigosidade observada ( $H_o$ ); e índice de fixação ( $F$ ) também foram calculados pelo programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012).

## **Estrutura genética**

A estrutura genética foi avaliada por duas abordagens, frequentista e bayesiana. A principal diferença entre as duas é que a frequentista testa os dados a luz de uma hipótese, com base em um modelo teórico que se julga verdadeiro, calculando a probabilidade de um resultado, que pode ser definida como a chance de encontrar esse resultado em uma sequência de experimentos repetidos. A estatística bayesiana diz que os dados experimentais são verdadeiros, já que o pesquisador os observou e propõem um modelo a partir dos dados, assim as respostas dependem do que o pesquisador observa em seus experimentos, podendo inferir sobre a probabilidade de diferentes hipóteses.

Para abordagem frequentista calculamos as estatísticas F de Wright (1931) com auxílio do suplemento GenAlEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012). Para abordagem bayesiana utilizamos o programa Structure 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000) para a estimativa do número de grupos K e para atribuir os indivíduos para um ou mais grupos K. Na análise, foi definido que o número de grupos K variasse entre 1 a 13. O modelo foi executado por 10 simulações independentes para cada K. Usou-se um comprimento “burn-in” de 10 mil interações e o comprimento de execução foi de 100 mil interações. O número mais provável de populações foi calculado pelo programa online Structure Harvester (EARL e VONHOLDT, 2011) estimando-o de acordo com o valor do modelo ( $\Delta K$ ), seguindo os procedimentos de Evanno et al., (2005).

## **Distância genética e Agrupamento**

A distância genética entre as populações foi calculada como proposto por Nei (1987):  $D_A = 1 - \sum_i \sqrt{x_i y_i}$ , onde  $x_i$  e  $y_i$  são as frequências do alelo  $i$  nas populações  $x$  e  $y$ . A partir da matriz de distância de Nei foi feito um agrupamento entre as populações pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando o programa TreeFit 1.2 (KALINOWSKI, 2009). A árvore foi visualizada e editada pelo programa TreeView 1.6.6 (PAGE, 1996).

## **Análise de Variância Molecular**

A Análise de Variância Molecular (AMOVA, EXCOFFIER et al., 1992) foi calculada usando as medidas de distância genética par a par a partir do  $R_{ST}$ , (SLATKIN, 1995) pelo suplemento GenAlEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012) para estimar a variância dentro das populações, entre populações e entre regiões. Essa análise foi feita considerando refúgios e não refúgios como regiões, ou grupos.

## RESULTADOS

### Comparação da diversidade genética entre refúgio e não refúgio

Considerando os índices por localidade (Tabela 3), a maior média de alelos por loco ( $A$ ) foi de AI com  $11,12 \pm 0,89$ , seguido de JE com média de  $10 \pm 1,13$  alelos por loco e SR também com média de  $10 \pm 0,71$  alelos por loco. A localidade com maior número de alelos exclusivos foi SR ( $A_{ex} = 14$ ) seguido por JE ( $A_{ex} = 11$ ) e BE ( $A_{ex} = 10$ ). O índice de diversidade de Shannon e heterozigosidade esperada apresentaram maiores valores nas populações de não refúgio do vale do Rio Doce. Em AI ( $I = 1,97$ ,  $H_e = 0,81$ ), SR ( $I = 1,89$ ,  $H_e = 0,81$ ) e IB ( $I = 1,75$ ,  $H_e = 0,76$ ). O índice de fixação ( $F$ ) foi baixo a moderado para todas as populações, com destaque para os valores extremos UN ( $F = 0,03 \pm 0,07$ ) e IB ( $F = 0,17 \pm 0,05$ ).

Tabela 3: Diversidade genética e índice de fixação de 13 populações de *Melanoxylon brauna*.

	$A$	$A_{ex}$	$A_e$	$I$	$H_o$	$H_e$	$F$
<b>LE</b>	6,471	1*	4,194	1,502	0,628	0,707	0,099
<b>IC 95%</b>	$\pm 0,624$	-	$\pm 0,571$	$\pm 0,105$	$\pm 0,037$	$\pm 0,030$	$\pm 0,050$
<b>AM</b>	8,529	5*	3,764	1,502	0,631	0,667	0,069
<b>IC 95%</b>	$\pm 0,862$	-	$\pm 0,403$	$\pm 0,125$	$\pm 0,063$	0,046	$\pm 0,059$
<b>MA</b>	8,353	4*	3,895	1,483	0,599	0,661	0,106
<b>IC 95%</b>	$\pm 0,857$	-	$\pm 0,542$	$\pm 0,132$	$\pm 0,059$	$\pm 0,047$	$\pm 0,054$
<b>JE</b>	10,000	11*	4,944	1,669	0,609	0,706	0,141
<b>IC 95%</b>	$\pm 1,128$	-	$\pm 0,861$	$\pm 0,140$	$\pm 0,054$	$\pm 0,042$	$\pm 0,058$
<b>IT</b>	8,471	7*	4,118	1,538	0,620	0,763	0,072
<b>IC 95%</b>	$\pm 0,791$	-	$\pm 0,460$	$\pm 0,136$	$\pm 0,064$	$\pm 0,052$	$\pm 0,061$
<b>PO</b>	8,647	4*	4,200	1,562	0,651	0,702	0,055
<b>IC 95%</b>	$\pm 1,169$	-	$\pm 0,497$	$\pm 0,127$	$\pm 0,033$	$\pm 0,039$	$\pm 0,034$
<b>UN</b>	7,706	7*	3,006	1,351	0,612	0,630	0,030
<b>IC 95%</b>	$\pm 0,835$	-	$\pm 0,216$	$\pm 0,094$	$\pm 0,059$	$\pm 0,035$	$\pm 0,067$
<b>BE</b>	9,353	10*	5,096	1,675	0,653	0,695	0,050

<b>IC 95%</b>	±0,996	-	±0,604	±0,176	±0,068	±0,066	±0,036
<b>SC</b>	8,059	3*	3,753	1,463	0,649	0,656	0,034
<b>IC 95%</b>	±0,829	-	±0,446	±0,126	±0,060	±0,045	±0,046
<b>PS</b>	9,000	4*	5,131	1,587	0,568	0,676	0,153
<b>IC 95%</b>	±1,361	-	±0,999	±0,182	±0,063	±0,058	±0,064
<b>IB</b>	8,412	4*	5,163	1,749	0,621	0,763	0,175
<b>IC 95%</b>	±0,758	-	±0,657	±0,104	±0,036	±0,023	±0,051
<b>SR</b>	10,000	14*	5,584	1,886	0,743	0,804	0,069
<b>IC 95%</b>	±0,707	-	±0,420	±0,073	±0,028	±0,015	±0,042
<b>AI</b>	11,118	4*	5,996	1,970	0,754	0,809	0,064
<b>IC 95%</b>	±0,887	-	±0,571	±0,088	±0,033	±0,018	±0,039

A= média do número de alelos;  $A_{ex}$  = média de alelos exclusivos;  $A_e$  = média de alelos efetivos; I = índice de diversidade de Shannon;  $H_o$  = heterozigosidade observada;  $H_e$  = heterozigosidade esperada;  $F$  = índice de fixação e IC = intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

\*Soma

Considerando agora o total de 384 indivíduos de *Melanoxylon brauna* genotipados usando 17 pares de *primers*, foi detectado um total de 420 alelos, sendo 71 exclusivos de refúgios 65 exclusivos de não refúgios. Não houve diferença significativa na média do número de alelos por loco e número de alelos efetivos entre refúgio e não refúgio. Também não houve diferença no índice de diversidade de Shannon (I),  $H_e$  e  $H_o$ . (Tabela 4).

Tabela 4: Medidas de diversidade genética de *Melanoxylon brauna* comparando “refúgio” e “não refúgio”.

	A	$A_{ex}$	$A_e$	I	$H_o$	$H_e$
<b>Refúgio (n=205)</b>						
<b>Média</b>	20.882	4.176	7.913	2.268	0.631	0.834
<b>Soma</b>	355	71	134.517	-	-	-
<b>Não refúgio (n=179)</b>						
<b>Média</b>	20.529	3.823	8.000	2.312	0.666	0.838
<b>Soma</b>	349	65	136.007	-	-	-

A= número de alelos;  $A_{ex}$  = número de alelos exclusivos;  $A_e$  = alelos efetivos; I = índice de diversidade de Shannon;  $H_o$  = heterozigosidade observada;  $H_e$  = heterozigosidade esperada e n = número amostral.

## Estrutura genética

O valor de K que melhor se ajustou aos dados foi K=2 ( $\Delta K = 29,96$ , Figura 3). O gráfico de barras com K=2 gerado pelo Structure mostra uma separação entre as amostras coletadas em (LE, AM, MA e JE), amostras das regiões dos planaltos da Bahia (*cluster 1*), e as demais populações das áreas de baixada da Bahia e as amostras de Minas Gerais e Espírito Santo (*cluster 2*), mostrando que há estrutura entre as populações do sudoeste da Bahia e as outras populações, embora poucos indivíduos ainda apresentem composição genética dos dois grupos (Figura 4a).

O segundo valor de K que melhor se ajustou aos dados foi K=3 ( $\Delta K = 6,77$ ), o gráfico gerado (Figura 4) mostra a separação de três grupos, (LE, AM, MA e JE), (IT, PO, BE, UN, SC e PS) e (IB, SR e AI). O terceiro maior valor de  $\Delta K$  foi atribuído ao K=10 ( $\Delta K = 6,04$ ). Nesse agrupamento quase todas as populações são separadas, exceto (AM e MA), (PO e BE) e (SR e AI) (figura 4). O  $F_{ST}$  geral foi 0,183. O maior valor de  $F_{ST}$  par a par foi 0,179 entre as localidades MA e IT e o menor valor de  $F_{ST}$  foi de 0,04 entre BE e PO (Tabela 5).

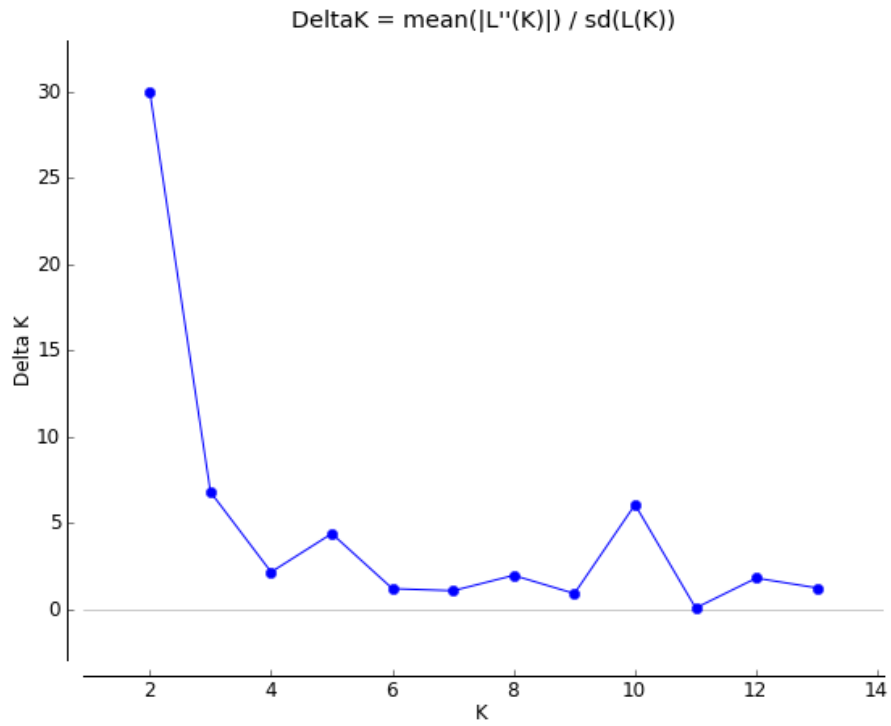


Figura 3: Resultado da análise utilizando o software Structure Harvester para sugerir o melhor valor de K para os indivíduos de *Melanoxylon brauna*.

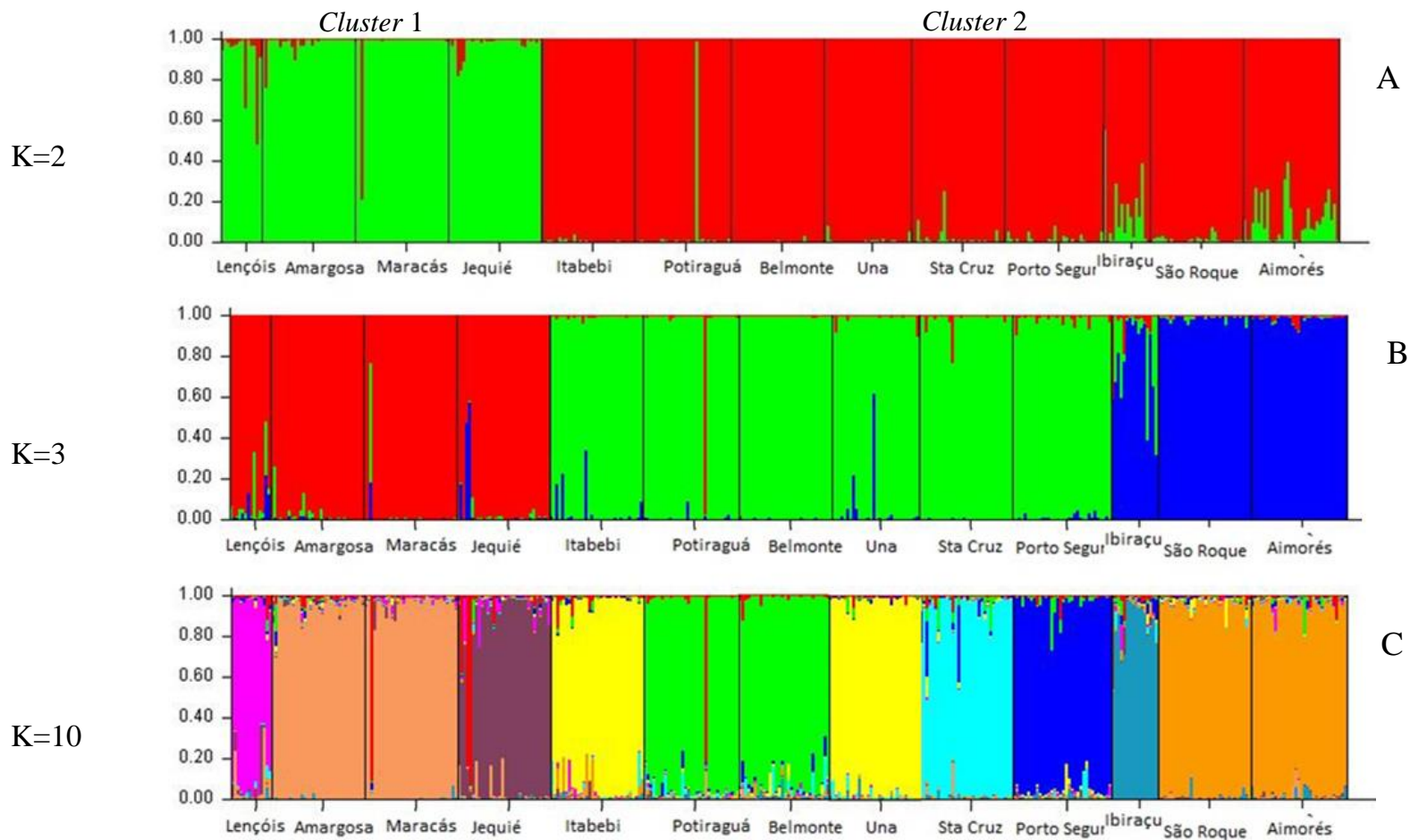


Figura 4: Relações genéticas em 13 populações de *Melanoxylon brauna* (384 indivíduos) estimadas utilizando programa Structure baseado em marcadores microssatélites. O gráfico A ( $K = 2$ ) mostra o arranjo mais provável, baseado no valor de  $\Delta K$  segundo método de Evano. Os gráficos B e C ( $K=3$  e  $K=10$ ) mostram outras possibilidades de agrupamento com maiores valores de  $\Delta K$ .



Tabela 5: Valores de estrutura genética com base no  $F_{ST}$  par a par para as 13 populações de *Melanoxylon brauna*.

Localidade	AM	IB	IT	JE	LE	MA	PS	SR	SC	UN	BE	AI	PO
AM	0,000	N	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N
IB	0,113	0,000	B	N	N	N	B	B	B	B	B	B	B
IT	0,156	0,115	0,000	N	N	N	B	B	B	B	B	B	B
JE	0,085	0,097	0,150	0,000	P	P	N	N	N	N	N	N	N
LE	0,092	0,105	0,135	0,081	0,000	P	N	N	N	N	N	N	N
MA	0,050	0,112	0,179	0,077	0,076	0,000	N	N	N	N	N	N	N
PS	0,136	0,085	0,094	0,133	0,133	0,141	0,000	B	B	B	B	B	B
SR	0,108	0,059	0,091	0,095	0,096	0,111	0,098	0,000	B	B	B	B	B
SC	0,134	0,106	0,121	0,120	0,138	0,139	0,090	0,107	0,000	B	B	B	B
UN	0,163	0,114	0,070	0,154	0,148	0,170	0,079	0,106	0,107	0,000	B	B	B
BE	0,130	0,099	0,115	0,133	0,143	0,153	0,093	0,101	0,087	0,126	0,000	B	B
AI	0,107	0,054	0,101	0,096	0,091	0,107	0,094	0,046	0,101	0,121	0,081	0,000	B
PO	0,121	0,088	0,116	0,131	0,132	0,140	0,095	0,098	0,085	0,120	0,040	0,076	0,000

P= ambas as populações foram coletadas no planalto;

B= ambas as populações foram coletadas na baixada;

N= as populações foram coletadas em altitudes diferentes.

## Agrupamento

A análise de agrupamento mostrou formação de dois ou três grupos consistentes. Os valores de *bootstrap* dos ramos para formação destes grupos foram superiores a 94%. Este agrupamento está visivelmente ligado à localização geográfica das populações. O primeiro nó separa os grupos (LE, AM, MA e JE) e (UN, IT, PO, BE, SC, PS, SR, AI, IB) e o segundo nó separa (UN, IT, PO, BE, SC e PS) de (SR, AI, IB).

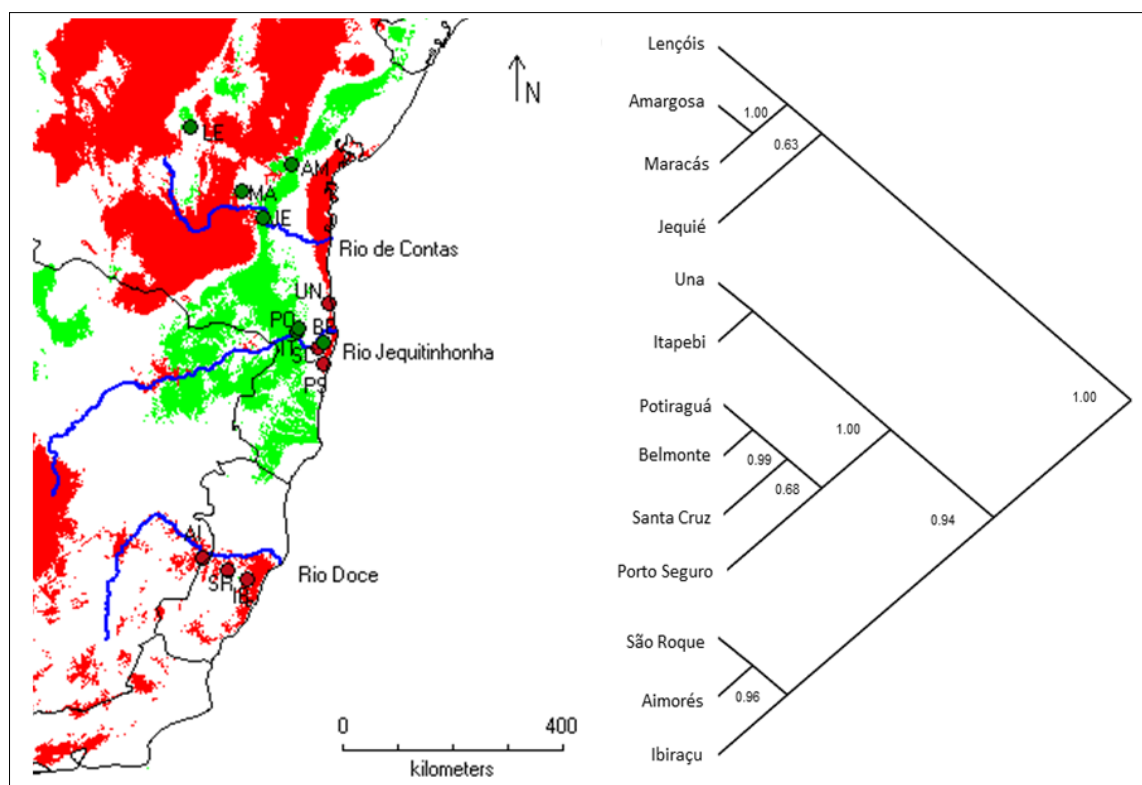


Figura 5: À esquerda, pontos de coleta de *M. brauna*. Os refúgios são mostrados em verde e os não refúgios em vermelho. Os círculos e as siglas indicam os pontos onde as amostras foram coletadas e as referências das localidades. À direita dendrograma representando as distâncias genéticas de Nei (1987) entre populações. A confiabilidade de cada nó foi estimada a partir de 1000 bootstraps.

## Análise Molecular de Variância

As estimativas de variação dentro e entre populações e entre regiões calculadas pela AMOVA mostraram que a maior parte da variância total é atribuída à variação dentro das populações 86%,  $p < 0,00$ , enquanto a variação atribuída a diferenças entre populações é de 14%,  $< 0,00$  e 0%,  $p < 0,00$  foi atribuída à variação entre regiões.

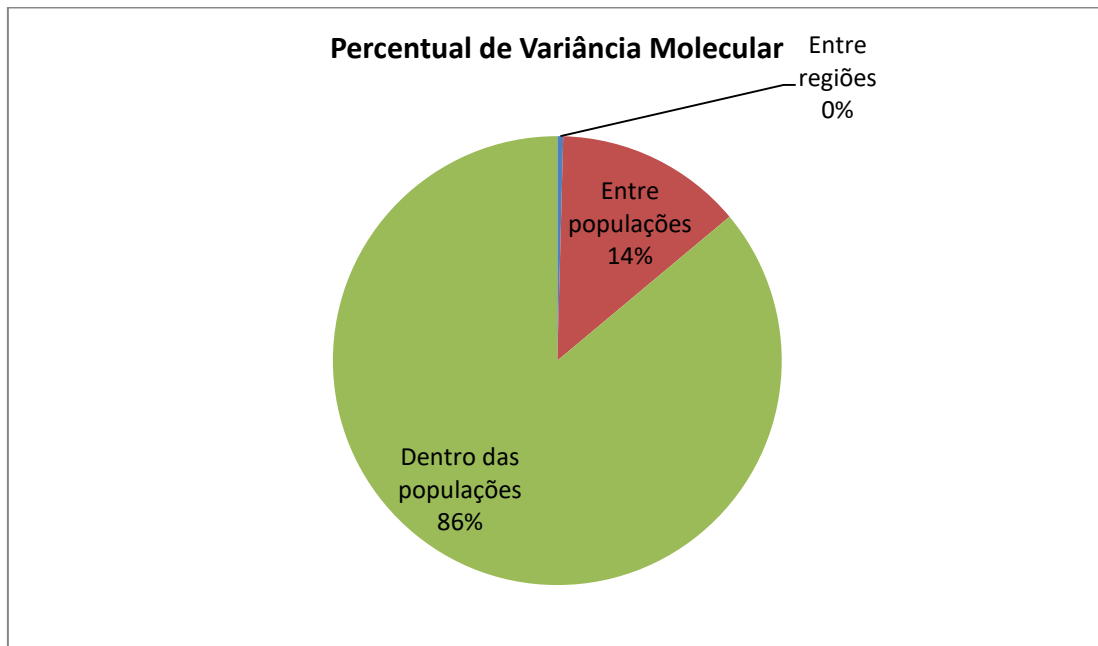


Figura 6: Partição da variação genética pela Análise Molecular de Variância. Em verde a variação atribuída a diferenças dentro das populações, em vermelho entre populações e em azul, entre regiões.

## DISCUSSÃO

Este trabalho mostrou pela primeira vez o modelo paleoclimático de Carnaval e Moritz, (2008) sendo testado em um desenho específico com critério de seleção de áreas que levou em consideração réplicas localizadas explicitamente em áreas com alta e baixa probabilidade de ter permanecido florestada durante o último máximo glacial, propostas como refúgios e não refúgios. Essa também foi primeira vez que este modelo foi testado para uma espécie arbórea longeva e endêmica da Floresta Atlântica.

Os resultados desse trabalho não concordaram precisamente o modelo de Carnaval e Moritz, 2008 e com os resultados de Carnaval et al., 2009. Populações que foram amostradas em regiões tidas como estáveis pelo modelo (CARNAVAL e MORITZ, 2008) não apresentaram níveis de diversidade genética significativamente mais altos do que em populações localizadas em áreas de baixa estabilidade. No entanto os dados desse estudo, que revelaram maior diversidade genética em populações de *M. brauna* que ocorrem no Vale do Rio Doce corroboram com Carnaval et al., 2014 que sugere áreas de estabilidade em florestas de topos de morros próximas e ao sul do Rio Doce.

### **Diversidade genética**

A diferença no número de alelos exclusivos entre áreas de refúgio e não refúgio foi pequena para comprovar a hipótese inicial deste trabalho de que haveria maior diversidade em áreas de refúgio quando comparadas a áreas de não refúgio. Além disso, o maior número de áreas e indivíduos amostrados nas áreas de refúgio pode ter contribuído para revelar um número maior de alelos exclusivos neste grupo de populações. Em nenhum outro índice foi observada maior média de diversidade genética nos refúgios, refutando nossa hipótese inicial de que as populações coletadas em áreas previstas como refúgios teriam maior diversidade genética. Isso se deu porque as localidades AI, SR e IB (vale do Rio Doce) apresentaram altos índices de diversidade elevando as médias dos não refúgios. Entretanto, estas três localidades possuem particularidades que serão explicitadas a seguir.

Os maiores valores nos índices de diversidade genética ( $I$ ,  $H_o$  e  $H_e$ ) foram obtidos para as populações coletadas no vale do Rio Doce (AI, SR e IB), indicando que essa área, apesar de ter sido considerada como de baixa probabilidade de ter permanecido florestada pelo modelo de Carnaval e Moritz, (2008) pode ter sido uma área de estabilidade para *M. brauna* no passado. Neste caso, a área de estabilidade seria uma localidade em que, mesmo sob clima severo e flutuante, teria continuado abrigando espécimes de *M. brauna* devido a características particulares da biologia da espécie. Há duas possibilidades que em conjunto podem explicar os resultados obtidos: *M. brauna* tem peculiaridades que podem ter interferido na adequação ao modelo dos refúgios e o modelo ter sido falho em não prever áreas florestadas no vale do Rio Doce.

*Melanoxylon brauna* é uma árvore que ocorre em floresta estacional e semidecidual, indicando que pode ser mais resistente a períodos de seca em comparação a outros grupos, como anfíbios. Então, mesmo que o vale do Rio Doce tenha sido mais seco no passado, essa severidade climática pode não ter sido suficiente para impedir a manutenção de populações de *M. brauna*, assim o modelo pode ter sido adequado para prever distribuição de alguns táxons típicos de florestas ombrófilas, mas inapropriado para prever a distribuição de táxons que ocorrem também em florestas estacionais e de topo de morro, como a espécie em questão. De fato Carnaval et al., 2014 e Porto et al., 2013 preveem áreas de endemismo em florestas montanas e de topos de morro do Sul (abaixo do Rio Doce).

Outros grupos apresentaram padrão semelhante ao visto em *M. brauna* ao sul do refúgio da Bahia: *Marmosops incanus* e *Phyllomys pattoni*, duas espécies de roedor apresentaram maior diversidade genética no DNA mitocondrial ao sul do refúgio Bahia (MISTRANGI e PATTON, 1997; LEITE, 2003), dados que foram citados no trabalho de Carnaval e Moritz, (2008) como não congruentes com a hipótese dos autores e que corroboram a suposição de que o vale do Rio Doce foi uma área de estabilidade, pelo menos para algumas espécies.

Também em concordância com os resultados desse estudo, Pinheiro, et al., 2013 observou maiores níveis de diversidade genética fora dos refúgios propostos por Carnaval e Moritz, 2008 na espécie de orquídea *Epidendrum denticulatum*.

Além disso, se forem consideradas apenas as populações da baixada da Bahia que foi a única área onde populações geograficamente próximas de refúgios (IT, PO e BE; n=95) e não refúgios (UN, SC e PS; n= 98) foram coletadas, observamos que as populações de refúgio têm maior número de alelos exclusivos ( $A_{ex}= 21$ ) que as do não

refúgio costeiro ( $A_{ex}= 14$ ), indicando que as áreas de não refúgio podem ter sofrido redução populacional ou efeito fundador, sendo recolonizadas por populações remanescentes.

## **Endogamia**

Os valores de  $F$  foram baixos a moderados em todas as localidades, decorrência do elevado número de heterozigotos, o que significa que para a maioria das populações não houve desvio de panmixia devido ao sistema reprodutivo. Esses baixos valores de  $F$  poderiam estar relacionados ao tipo de amostragem, pois foram coletados e analisados jovens e adultos. Os adultos de espécies arbóreas, por refletirem uma diversidade genética anterior à fragmentação da Mata Atlântica, tendem a ser mais heterozigóticos, abaixando assim a média do índice de fixação (MORAES, 2012; REIS, 2013). No entanto, apesar de terem sido incluídos tanto jovens como adultos na análise, o número de adultos não chegou a 10% do total de jovens amostrados, descartando a possibilidade de viés nesta análise em decorrência de eventuais baixos níveis de homozigosidade encontradas em adultos. Os mais altos valores de  $F$  foram encontrados em IB, PS, JE e MA. Nas populações com  $F$  moderado também se observou que as médias de heterozigosidade esperada foram maiores que as de heterozigosidade observada, corroborando que estas quatro localidades apresentam uma branda endogamia. Outro fator que pode ter influenciado a baixa medida de endogamia é o número de adultos reprodutivos remanescentes nas populações, coletados ou não, pois se existem muitos adultos floridos simultaneamente a chance de haver polinização cruzada é maior, assim os jovens coletados em uma população que tem ou teve muitos adultos se reproduzindo, tem menos chance de ter dois alelos idênticos por descendência.

O sistema reprodutivo de *M. brauna* nunca foi estudado, mas apesar dessa espécie ter flores hermafroditas, os baixos índices de fixação sugerem que, de alguma forma, a fertilização cruzada deve ser favorecida. Os visitantes florais (abelhas *Apis* e *Xylocopa*) observados nas flores de *M. brauna* por nossa equipe, se realmente as polinizam, são capazes de transportar pólen por longas distâncias (NOGUEIRA-NETO, 1997), diminuindo as chances de autofecundação e de cruzamentos entre aparentados, diminuindo, assim, o índice de fixação.

## Estrutura genética e agrupamento

O número de grupos mais provável, com o maior valor de  $\Delta K$ , segundo método de Evano é  $K = 2$ , separando geneticamente LE, AM, MA e JE das demais localidades. A mesma separação foi encontrada na análise frequentista de agrupamento feita com o UPGMA, baseado na estatística de Nei. O segundo número de grupos mais provável  $K = 3$ , que mostra o mesmo padrão entre as populações do planalto (LE, AM, MA, JE), porém há uma segunda divisão que separa as populações da baixada da Bahia (UN, IT, PO, BE, SC e PS) do vale do Rio Doce (IB, SR e AI), o mesmo agrupamento foi encontrado no segundo nó do agrupamento UPGMA (Figura 5). Esta estrutura genética revelada entre a baixada da Bahia e o Vale do Rio Doce se deve provavelmente a isolamento genético devido a distância física entre estas localidades, mesmo que elas compartilhem o mesmo pool gênico das populações de baixada, que se diferem de forma muito mais acentuada das populações do planalto. O terceiro número de grupos mais provável,  $K = 10$  (gráfico C, Figura 4), mostra que há uma grande similaridade entre AM e MA, que pode ser explicada pela localização geográfica dessas duas populações que se encontram no planalto da Bahia. A menor distância geográfica entre as populações do planalto é observada entre MA e JE, no entanto JE está separada das demais populações do planalto pelo Rio de Contas. Como será discutido a seguir, os rios não foram uma barreira genética que impediu o fluxo gênico de *M. brauna*. Porém, neste caso pode ter dificultado a migração, isso explicaria a maior similaridade entre AM e MA, mesmo que a menor distância geográfica entre as populações do planalto da Bahia seja entre MA e JE. O gráfico C (Figura 4) mostra um forte agrupamento entre AI e SR que também pode ser explicado pela pequena distância geográfica entre essas populações. No entanto o agrupamento de PO e BE não pode ser explicado pela distância geográfica nem mesmo pela presença de rios, pois estão separadas pelo Rio Jequitinhonha e mesmo assim apresentam maior similaridade entre si em comparação com PO e IT que estão muito próximas geograficamente e na mesma margem do rio. Nas duas análises (bayesiana e frequentista) fica claro que há uma grande similaridade entre AM e MA, PO e BE e SR e AI que é corroborado pelo baixo valor de  $F_{ST}$  entre essas populações.

Os agrupamentos ( $k=2$ ,  $k=3$  e  $k=10$ ) indicados pelos três maiores valores de  $\Delta K$  foram corroborados através das outras análises realizadas, entretanto o valor de  $\Delta K$  que

aponta para dois grupos é muito superior que o valor para três ou 10 grupos, evidenciando que os dados suportam melhor a separação das amostras em dois grupos (populações de planalto e populações de baixada).

A análise de agrupamento por distância genética, usando o algoritmo UPGMA, assim como o agrupamento por abordagem bayesiana e a análise molecular de variância não mostraram uma separação das populações em refúgios e não refúgios. Em ambas as análises de agrupamento houve uma clara separação entre as populações das regiões planálticas (JE, LE, MA e AM) e as demais. O valor moderado do  $F_{ST}$  geral (0,183) provavelmente reflete esta estruturação, que também foi observada através do  $F_{ST}$  par a par (Tabela 5) e da análise de agrupamento (Figura 5), já que os maiores valores de dissimilaridade foram encontrados entre as populações dos planaltos da Bahia (*cluster* 1) e as populações da baixada da Bahia e vale do Rio Doce (*cluster* 2). Portanto, a principal barreira geográfica que pode ter evitado o fluxo gênico seria a altitude. LE está localizada na Chapada Diamantina, MA no Planalto de Maracás-Jaguaquara e JE no Planalto de Conquista, todas situadas na porção norte da Cadeia do Espinhaço e inseridas na região de refúgio. Esse dado sugere as populações planálticas do refúgio podem ter ficado isoladas e, se realmente as porções litorâneas da Bahia (UN, PS e SC) se tornaram desprovidas de populações de *M. brauna* durante a glaciação, a recolonização não foi via populações do planalto, e sim por populações remanescentes de baixada, similares ou às próprias populações de refúgio amostradas (IT, PO e BE). Foi observada, pelo agrupamento utilizando distância de Nei, uma similaridade entre estas localidades da baixada da Bahia, provavelmente devido a pequena distância entre elas e por estarem inseridas na mesma região biogeográfica.

Apesar da provável barreira da altitude, o gráfico de barras gerado pelo Structure mostrou que todas as populações, tanto do *cluster* 1 quanto do *cluster* 2, tem alguns indivíduos com composição genética de ambos os grupos, que pode ser visto mais notoriamente nas populações do vale do Rio Doce IB e AI, onde vários indivíduos apresentam as duas cores, verde e vermelho. Isso pode indicar remotamente que ainda haja fluxo gênico entre as populações dos planaltos da Bahia e as populações do Vale do Rio Doce, ou que provavelmente houve uma conexão no passado e o tempo de separação entre elas ainda não foi suficiente para uma completa estruturação. Os valores de  $F_{ST}$  também suportam essa observação de uma maior proximidade entre o planalto (JE, AM, MA e LE) e o vale do Rio Doce (AI, SR e IB), que são as populações mais distantes geograficamente. Já as populações do planalto e a baixada da Bahia (JE, AM,



MA, LE e UN, IT, PO, BE, SC, PS respectivamente) que são populações mais próximas, apresentam valores mais altos de  $F_{ST}$ . A princípio, esse resultado parece um contrassenso, no entanto pode fazer sentido se considerarmos que o contato entre essas áreas pode ter sido via Cadeia do Espinhaço, que é onde se localizam as populações JE, AM, MA e LE e também onde nasce o Rio Doce, em cujo vale, as populações AI, SR e IB foram coletadas.

De maneira geral, os rios são descritos na literatura como barreiras geográficas capazes de impedir o fluxo gênico e causar estruturação em diversos grupos, como roedores e anfíbios (ZHAO, 2009, RESENDE et al., 2010). No entanto, o Rio de Contas não foi uma barreira genética para *M. brauna*, pois JE foi agrupada com AM, MA e LE, tanto pelo Structure, quanto pela distância par a par, apesar de estarem separadas pelo Rio de Contas. A falta de estrutura entre essas populações também foi corroborado pelo  $F_{ST}$  visto que os valores par a par foram baixos (menores que 0,08) para as combinações JE x AM, JE x LE, JE x MA. Outra observação foi que, dentre todas as combinações, o menor valor de  $F_{ST}$  foi encontrado entre PO e BE, portanto, apesar dessas populações estarem separadas pelo Rio Jequitinhonha, os resultados mostraram que este não é uma barreira genética para *M. brauna*, assim como o Rio de Contas. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Ribeiro et al., 2011 para *Dalbergia nigra*, uma Fabaceae que, assim como *M. brauna*, tem suas sementes dispersas pelo vento. *D. nigra* apresentou forte estrutura latitudinal, formando três grupos entre a Bahia e São Paulo, no entanto, para aquela espécie os Rios Doce e Jequitinhonha também não impediram fluxo gênico.

Assim, os resultados obtidos deixam claro que os dois grupos genéticos, revelados por métodos independentes de análise, não mostraram estrutura genética entre refúgios e não refúgios segundo modelo paleoclimático de Carnaval e Moritz (2008), mas sim entre populações coletadas em diferentes regiões biogeográficas.

### **Implicações para conservação**

Esse trabalho trouxe contribuições importantes para o manejo da espécie, por revelar um possível efeito biogeográfico que influencia a estruturação genética da espécie.

Se realmente houve uma retração das populações de *M. brauna* na glaciação, isso só foi percebido nas populações PS, SC e UN. Por ter menor diversidade genética, as populações dessas áreas precisam ser protegidas e conservadas em grandes reservas para manter populações mínimas viáveis. Atualmente a única população inserida nessas condições é a de PS, coletada na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Estação Veracel.

Cada uma das regiões amostradas, planaltos da Bahia, baixada da Bahia e vale do Rio Doce, tem pelo menos uma população com altos níveis de diversidade genética e maior contagem de alelos exclusivos, são elas JE, BE, AI e SR. Assim, essas populações são recomendadas para coletas de sementes para fins de programas de restauração de áreas degradadas e formação de bancos de germoplasma. Recomenda-se ainda, que as coletas de semente para fins de recomposição de florestas devem ser feitas nas populações mais próximas ao plantio, já que foi observada estruturação genética devido a barreiras geográficas baseadas no relevo e altitude.

Observou-se que em todas as áreas visitadas (Exceto a RPPN Estação Veracel, em Porto Seguro) houve exploração intensa e recente de madeira, pois a grande maioria dos espécimes de *M. brauna* encontradas estavam cortados e rebrotando, quando não em forma de cercas e mourões. Apesar disso, essa espécie ainda não mostrou índices de endogamia preocupantes, evidenciado pela alta heterozigosidade calculada a partir de amostras compostas predominantemente por indivíduos jovens. Isso demonstra que ainda é possível recuperar as populações de *M. brauna* se houver ações de replantios ou reintroduções da espécie em áreas destinadas a restauração florestal.

## REFERÊNCIAS

- ALDENHOVEN, J. T. et al. Phylogeography of ninespine sticklebacks (*Pungitius pungitius*) in North America: glacial refugia and the origins of adaptive traits. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 18, p. 4061–76, 2010.
- AMARAL, F. R. et al. Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic Forest antbirds (*Myrmeciza*). **Molecular Ecology**, v. 22, n. 15, p. 3996–4013, 2013.
- ANDRADE, I. M. et al. A Preliminary Study of Genetic Variation in Populations of *Monstera adansonii* var. *klotzschiana* (Araceae) from North-East Brazil, Estimated with AFLP Molecular Markers. **Annals of Botany**, p. 1–12, 2007.
- ANDRADE, I. M. et al. Genetic variation in natural populations of *Anthurium sinuatum* and *A. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* (Araceae) from north-east Brazil using AFLP molecular markers. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 159, p.88-105, 2009.
- AVISE, J. C.; WALKER, D. Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. **Proceedings of Biological Sciences**, v. 265, n. 1395, p. 457–63, 1998.
- BENNETT, K.; BHAGWAT, S.; WILLIS, K. Neotropical refugia. **The Holocene**, v. 22, n. 11, p. 1207–1214, 2012.
- BENNETT, K.; PROVAN, J. What do we mean by “refugia”? **Quaternary Science Reviews**, v. 27, n. 27-28, p. 2449–2455, 2008.
- BORGES, D. B. **Diversidade genética em populações naturais de *Melanoxylon brauna schott* (fabaceae) por meio de marcadores ISSR**. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 32p., 2011.
- BORGES, D. B. et al. Optimization of DNA extraction from fresh leaf tissues of *Melanoxylon brauna* (Fabaceae). **Genetics and molecular research**, v. 11, n. 2, p. 1586–91, 2012.
- BORGES, D. B.; MARIANO-NETO, E.; GAIOTTO, F. A. Development of microsatellite primers for *Melanoxylon brauna* (Fabaceae): an endangered and endemic tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Genetics Resources**, p. 1-4, 2014.
- BROWN, J. H.; LOMOLINO, M. V. **Biogeografia**. 2.ed. Ribeirão Preto, Brasil: FUNPEC, 691p., 2006.
- CARNAVAL, A. C. et al. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 785–9, 2009.

CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 7, p. 1187–1201, 2008.

CARNAVAL, A. C. et al. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. **Proceedings of Biological Sciences**, v. 281, p. 1-9, 2014.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, 2011.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–20, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes. **Application**, v. 491, p. 479–491, 1992.

FITZPATRICK, S. W. et al. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 13, p. 2877–96, 2009.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forests birds. **Science**, v.165, n. 3889, p. 131-137, 1969.

HIJMENS, R. J. et al. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 127, p. 15-19, 2001.

KALINOWSKI, S. T. How well do evolutionary trees describe genetic relationships among populations? **Heredity**, v. 102, n. 5, p. 506–13, 2009.

KNOWLES, L. L.; RICHARDS, C. L. Importance of genetic drift during Pleistocene divergence as revealed by analyses of genomic variation. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 13, p. 4023–32, 2005.

LEITE, Y. L. Evolution and systematics of the Atlantic tree rats, genus *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae), with description of two new species. **University of California Publications in Zoology**, v. 132, p.111–118, 2003.

MARTINS, F. M. et al. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 294, 2009.

MARTINS, F. M.. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 104, n. 3, p. 499–509, 2011.

MORAES, R. C. S. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Manilkara multifida* Penn. no sul da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz. 2012.

MUSTRANGI, M. A.; PATTON, J. L. Phylogeography and systematics of the slender mouse opossum *Marmosops* (Marsupialia, Didelphidae). **University of California Publications in Zoology**, v. 86, p. 77-86, 1997.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 1. ed. São Paulo, Brasil: Nogueirapis, 446 p., 1997.

NOVAES, R. M. L. et al. Phylogeography of *Plathymeria reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 5, p. 985–98, 2010.

PAGE, R. D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences : CABIOS**, v. 12, n. 4, p. 357–8, 1996.

PEAKALL, R. e SMOUSE, P. GenAlEx 6 . 5 : Genetic analysis in Excel . Population genetic soft- ware for teaching and research – an update . v. 1, p. 6–8, 2012.

PETIT, J. et al. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. v. 156, p. 49–74, 2002.

PINHEIRO, F. et al. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. **Evolution**, v. 67, n. 7, p. 2024–2039, 2013.

PORTO, T. J.; CARNAVAL, A. C.; ROCHA, P. L. B. Evaluating forest refugial models using species distribution models, model filling and inclusion: a case study with 14 Brazilian species. **Diversity and Distributions**, v. 19, n. 3, p. 330–340, 2013.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–59, 2000.

REIS, J. B. L. **Diversidade, estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de jequitibá-rosa [*Cariniana legalis* Mart. O. Kuntze Lecythidaceae]**. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz. 104p., 2013.

RESENDE, H. C. et al. Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 101, n. 4, p. 949–960, 2010.

RIBEIRO, R. A. et al. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, v. 106, p. 46-57, 2011.

RICHARD, M.; THORPE, R. S. Can microsatellites be used to infer phylogenies? Evidence from population affinities of the Western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, n. 3, p. 351–60, 2001.

SLATKIN, M. A. Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. **Genetics**, v. 138, p. 457–462, 1995.

STEWART, J. R. et al. Refugia revisited : individualistic responses of species in space and time. **Proceedings of the Royal Society**, v. 277, p. 661–671, 2009.

THOMÉ, M. T. C. et al. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 3, p. 1018–31, 2010.

TOLLEFSRUD, M. M. et al. Genetic consequences of glacial survival and postglacial colonization in Norway spruce: combined analysis of mitochondrial DNA and fossil pollen. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 18, p. 4134–4150, 2008.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 1193–1213, 2013.

WALKER, M. J. et al. Pleistocene glacial refugia across the Appalachian Mountains and coastal plain in the millipede genus *Narceus*: evidence from population genetic, phylogeographic, and paleoclimatic data. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 25, 2009.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian population. **Genetics**, v. 16, p. 97–159, 1931.

ZHAO, D. et al. Mantle structure and dynamics under East Russia and adjacent regions. **Russian Geology and Geophysics**, v. 51, n. 9, p. 925–938, 2009.

ZAKHAROV, E. V; HELLMANN, J. J. Genetic differentiation across a latitudinal gradient in two co-occurring butterfly species: revealing population differences in a context of climate change. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 1, p. 189–208, 2008.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Os locos microssatélites desenvolvidos são extremamente eficientes para estudos de genética da conservação, genética de populações, genética da paisagem, ecologia molecular, evolução, fluxo gênico e estrutura populacional de *Melanoxylon brauna*.

Devido ao delineamento amostral robusto, os resultados mostraram que a espécie não respondeu ao modelo de Carnaval e Moritz (2008), não apresentando maior diversidade genética e alelos exclusivos nas áreas propostas como refúgios, provavelmente devido a características da espécie, pois *M. brauna* pode ser mais tolerante a períodos secos.

As populações apresentaram dois níveis de estruturação: uma separação mais consistente entre as florestas de altitude da Bahia e florestas da baixada e uma segunda separação que reflete um gradiente latitudinal entre a baixada da Bahia e o vale do Rio Doce.

## 6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 24, p. 5177–88, 2008.

ALDENHOVEN, J. T. et al. Phylogeography of ninespine sticklebacks (*Pungitius pungitius*) in North America: glacial refugia and the origins of adaptive traits. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 18, p. 4061–76, 2010.

BARROSO, G. M. et al. **Frutos e Sementes. Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledônea**. Viçosa: Editora UFV, 1999.

BEHLING, H.; LICHTER, M. Evidence of Dry and Cold Climatic Conditions at Glacial Times in Tropical Southeastern Brazil. **Quaternary Research**, v. 48, n. 3, p. 348–358, 1997.

BENNETT, K.; PROVAN, J. What do we mean by “refugia”? **Quaternary Science Reviews**, v. 27, n. 27-28, p. 2449–2455, 2008.

BROWN, J. H.; LOMOLINO, M. V. **Biogeografia**. 2.ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 691p., 2006.

CABANNE, G. S. et al. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 3, p. 760–73, 2008.

CADENA, C. D. et al. Latitude, elevational climatic zonation and speciation in New World vertebrates. **Proceedings of The Royal Society**, p. 1-8, 2012.

CARNAVAL, A. C. et al. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 785–9, 2009.

CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 7, p. 1187–1201, 2008.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**, Brasília: EMBRAPA - SPI, 1994.



CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 126, n. 4, p. 455-476, 2000.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 1, p. 105–115, 2003.

DLUGOSCH, K. M.; PARKER, I. M. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 1, p. 431–49, 2008.

ENGEL, V. L.; MARTINS, F. R. Reproductive phenology of Atlantic forest tree species in Brazil: an eleven year study **Tropical Ecology**, v. 46 p. 1-16, 2005.

FARIA, D. et al. Ferns, frogs, lizards, birds and bats in forest fragments and shade cacao plantations in two contrasting landscapes in the Atlantic forest, Brazil. **Biodiversity and Conservation**. v. 16, n. 8, p.2335-2357. 2007.

FARWIG, N.; BRAUN, C.; BÖHNING-GAESE, K. Human disturbance reduces genetic diversity of an endangered tropical tree, *Prunus africana* (Rosaceae). **Conservation Genetics**. v. 9. p. 317–326, 2008.

FITZPATRICK, S. W. et al. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 13, p. 2877–96, 2009.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**, 1. ed., Ribeirão Preto, Editora SBG, 261p., 2005.

FREELAND, J. R.; PETERSEN, S. D. **Molecular Ecology**. 2. ed. Wiley, 464p., 2011.

FUTUYAMA, D. J. **Biologia Evolutiva**, 3. ed. Editora Funpec , 1992.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Atlantic Forest hotspot status: an overview. In: Galindo-Leal, C.; CÂMARA, I. G. (Org.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International, Washington, 2003.

GARAY, I.; RIZZINI, C. M. **A Floresta Atlântica de Tabuleiros: Diversidade Funcional da Cobertura Arbórea**. Petrópoles: Editora Vozes, 2003.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. New York: Oxford University Press, 368p., 1999.

GONZAGA, A. L. **Madeira: Uso e Conservação**, Brasília: Editora Iphan Monumenta, 246p., 2006.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C.; KRUTOVSKY, K. V.; NEALE, D. B. Forest-tree population genomics and adaptive evolution. **The New Phytologist**, v. 170, n. 2, p. 227–38, 2006.

HAFFER, J. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. **Brazilian Journal Biology**, v. 68, p. 917–947, 2008.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forests birds. **Science**, v.165, n. 3889, p. 131-137, 1969.

HARDING, R. M.; BOYCE, A. J.; CLEGG, J. B. The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. **Genetics**, v. 132, n. 3, p. 847-859, 1992.

IBAMA. Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção, 2014. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/12/2014&jornal=1&pagina=115&totalArquivos=144>> Acesso em 24 Dez, 2014.

IBGE. Mapa de Biomas e Vegetação, 2004. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>> Acesso em 24 Jan, 2014.

KASHI, Y.; KING, D. G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 5, p. 253–9, 2006.

KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v. 49, p. 725-738, 1964.

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, n. 6, p.2868-2872, 1978.

LAWING, A. M.; POLLY, P. D. Pleistocene climate, phylogeny, and climate envelope models: an integrative approach to better understand species response to climate change. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28554, 2011.

LEWIS, G. P., SCHRIRE, B.; MCKINDER, B.; Lock, J. M. **The Legumes of the World**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

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

LITT, M.; LUTY, J. A. A. hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 44, p. 937-1401, 1989.

LOPES, A. V. A. et al. Long-term erosion of tree reproductive trait diversity in edge-dominated Atlantic forest fragments. **Biological Conservation**. v. 142, p. 1154-1165, 2009.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**, 1. ed, Odessa: Instituto Plantarum, 1992.

MARTÍNEZ-MEYER, E.; PETERSON, A.; HARGROVE, W. Ecological niches as stable distributional constraints on mammal species, with implications for Pleistocene extinctions and climate change projections for biodiversity. **Global Ecology and Biogeography**, v. 13, p. 305–314, 2004.

MARIANO-NETO, E. **Efeitos da fragmentação sobre comunidades arbustivo-arbóreas em Mata Atlântica, Una-BA**. Tese (Doutorado em Ecologia) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 221p., 2004.

MESQUITA, C. A. B. Exploração Madeireira no Sul da Bahia: Situação Atual e Perspectivas. **Revista dos Mestrados em Direito Econômico da Universidade Federal da Bahia. Ed. Especial de Direito Ambiental**. p 121-135, 1997.

MORIN, P. A. et al. Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 2, p. 498–504, 2009.

MUELLER-STARCK, G., ZIEHE, M., SCHUBERT, R. Genetic diversity parameters associated with viability selection, reproductive efficiency and growth in forest tree species. Cap. 5, p. 87-108 in: SCHERER-LORENZEN M, KÖRNER C. H., SCHULZE E. D. (Org.) **Forest Diversity and Function. Ecological Studies**, Heidelberg: Springer Verlag, 176p., 2005.

MYERS, N. et al. Biodiversity Hotspot for Conservation Priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NOGUÉS-BRAVO, D. et al. Climate change, humans, and the extinction of the woolly mammoth. **PLoS Biology**. v. 6, p. 79, 2008.

NOGUÉS-BRAVO, D. Predicting the past distribution of species climatic niches. **Global Ecology and Biogeography**, v. 18, n. 5, p. 521–531, 2009.

NOGUÉS-BRAVO, D. et al. Climate predictors of late quaternary extinctions. **International Journal of Organic Evolution**, v. 64, n. 8, p. 2442–9, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. **Catálogo das árvores nativas de Minas Gerais: Mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais**. Lavras: Editora UFLA, 2006.

PANDEY, S. et al. Genetic diversity in Indian cucumber based on microsatellite and morphological markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 19–27, 2013.

PARDINI, R. et al. The challenge of maintaining Atlantic forest biodiversity: a multi-taxa conservation assessment of an agro-forestry mosaic in southern Bahia. **Biological Conservation**. v. 142 p. 1178-1190, 2009.

PAULS, S. U. et al. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 4, p. 925–46, 2013.

PETERSON, A. T.; NYÁRI, A. Ecological niche conservatism and Pleistocene refugia in the thrush-like mourner, *Schiffornis* sp., in the Neotropics. **Evolution**, v. 62, p.173–183, 2008.

PIERCE, B. A., **Genética um Enfoque Conceitual**. Guanabara Koogan, 2004.

PRANCE, G. T. Climatic Forcing of Evolution in on the Refuge Theory of Biotic Differentiation Amazonia during the Cenozoic, **Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo**, 2002.

RESENDE, H. C. et al. Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 101, n. 4, p. 949–960, 2010.

RESENDE, L. C.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Diversity and genetic connectivity among populations of a threatened tree (*Dalbergia nigra*) in a recently fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. **Genética**, v. 139, n. 9, p. 1159–68, 2011.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.

RICHARD, M. ;THORPE, R. S. Can microsatellites be used to infer phylogenies? Evidence from population affinities of the Western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, n. 3, p. 351–60, doi:10.1006/mpev.2001.0981, 2001.

RIZZINI, C. T. **Árvores e Madeiras Úteis do Brasil: Manual de Dendrologia Brasileira**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1971.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COLSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 72, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHOEBEL, C. N. et al. Lessons learned from microsatellite development for nonmodel organisms using 454 pyrosequencing. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, n. 3, p. 600–11, doi:10.1111/jeb.12077, 2013.

SILVA, J. M. C.; CASTELETI, C. H. M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. (Org.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International, Washington, 2003.

SOLOMON, S. et al. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PLoS ONE**. v. 3, 2008.

THOMÉ, M. T. C. et al. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 3, p. 1018–31, 2010.

VALDEZ, L.; D'ELÍA, G. Differentiation in the Atlantic Forest: phylogeography of *Akodon montensis* (Rodentia, Sigmodontinae) and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia. **Journal of Mammalogy**, v. 94, n. 4, p. 911–922, 2013.

VIGUERA, E; CANCEILL, D; EHRLICH, S. D. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 10, p. 2587-2595, 2001.

ZALAPA , J. E. et al. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. **American Journal of Botany**, v. 99, p. 193–208, 2012.