

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



CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES PARA ESTUDO DA DIVERSIDADE E
FLUXO GÊNICO DE *Manilkara maxima* T.D. Penn. (Sapotaceae)
NO SUL DA BAHIA.

JOSÉ AUDENOR SILVA JÚNIOR

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2016

JOSÉ AUDENOR SILVA JÚNIOR

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES PARA ESTUDO DA DIVERSIDADE E
FLUXO GÊNICO DE *Manilkara maxima* T.D. Penn. (Sapotaceae)
NO SUL DA BAHIA.**

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, 2016**

S586 Silva Júnior, José Audenor.
Caracterização e aplicações de marcadores micros-
satélites para estudo da diversidade e fluxo gênico de
Manilkara maxima T.D. Penn. (Sapotaceae) no sul da
Bahia / José Audenor Silva Júnior. – Ilhéus, BA:
UESC, 2016.
ix, 42 f. : 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 vegetal. 2. Diversidade genética.
3. Microssatélites (Genética). 4. Marcadores genéti-
cos . 5. Áreas de conservação de recursos naturais.
I. Título.

CDD 581.35

JOSÉ AUDENOR SILVA JÚNIOR

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES PARA ESTUDO DA DIVERSIDADE E
FLUXO GÊNICO DE *Manilkara maxima* T.D. Penn. (Sapotaceae)
NO SUL DA BAHIA.**

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

Área de concentração: Genética e Biologia
Molecular.

APROVADA: 29 de fevereiro de 2016

Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio
(UESC)

Profa. Dra. Eliana Cazetta
(UESC)

Profa. Dra. Fabiana Felix Hackradt
(UFSB)

Profa. Dra. Fernanda Amato Gaiotto
(UESC – orientadora)

DEDICATÓRIA

À Deus,

Aos meus amados pais Audenor e Adeilza,

Às minhas queridas irmãs Tâmara e Talita,

Ao meu amor Myrna,

E a todos aqueles que me apoiaram,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pelo dom da vida, discernimento, compaixão e por guiar sempre meus passos.

Agradeço a minha família, aos meus pais Audenor e Adeilza por me ensinaram bons valores e costumes, além da enorme dedicação para minha formação e das minhas irmãs Tâmara e Talita. As estas duas meu agradecimento pelo exemplo de profissionais que são e por estarem presente e disponíveis quando sempre precisei.

Agradeço a minha namorada Myrna pelo apoio e compreensão durante esses dois anos, obrigado pela sua dedicação para comigo e pelos seus bons conselhos. Obrigado também pelo exemplo que é na busca pelo seus sonhos e objetivos, sou grato por você ter plantado essa semente dentro do meu coração. Amo você.

Agradeço aqueles que durante minha estadia em Ilhéus estiveram comigo, Diogo, Yara, Iago, Silvano e Mustang. Obrigado pela amizade e companheirismo, por sempre estarem dispostos a ajudar, e serem pessoas com grande coração.

Agradeço a professora Fernanda Gaiotto pela orientação durante esta pesquisa, pela competência com que orienta seus alunos tanto de mestrado quanto de doutorado. Obrigado pelo exemplo profissional e pessoal que você é. Obrigado pelos “puxões de orelha” o que permitiu que eu crescesse como ser humano, obrigado por me auxiliar em tudo que precisei, você é um bom exemplo para todos.

Aos meus colegas de laboratório e grupo de pesquisa, Rodrigo, Alesandro, Caio, Ramiris, Horlei, Acácia, Flora, Daniele e Daniela. Obrigado por estarem sempre dispostos a ajudar. Obrigado a todo apoio concedido e todas as dúvidas e questionamentos sanados. Obrigado pelas boas conversas e por deixarem o ambiente sempre mais leve para se conviver.

Meus sinceros agradecimentos aos colegas de campo, Jiomário (Bila), José Lima, pelo apoio dado em todas as expedições.

À Fabrícia e Mara pela paciência e pelo apoio durante os processos e tramites burocráticos.

A todos os professores que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À professora Deborah Faria pela coordenação do Projeto Sisbiota e pelo suporte dado por este projeto a execução das expedições a campo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – UESC pelo esforço em proporcionar aos discentes a excelência na formação científica.

À CAPES e FAPESB pelo apoio financeiro de suma importância para a realização desta pesquisa.

A todos meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

EXTRATO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
CAPÍTULO 1: Development of microsatellite markers for <i>Manilkara maxima</i> TD Penn (Sapotaceae) and its use in conservation genetics.....	10
Abstract	11
1. Introduction.....	12
2. Materials and Methods.....	12
3. Results and Discussion	13
4. References.....	14
CAPÍTULO 2: Análises genéticas revelam a importância de unidades de conservação para a manutenção da diversidade.	18
Resumo.....	18
1. Introdução	19
2. Material e Métodos	20
2.2. Fragmentos florestais e populações amostradas.....	20
2.3. Extração de DNA genômico e amplificação por PCR	22
2.4. Análises genéticas	23
3. Resultados	24
4. Discussão	28
5. Referências Bibliográficas	32
CONCLUSÕES GERAIS	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES	40

EXTRATO

SILVA-JÚNIOR, José Audenor, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2016. **Caracterização e aplicações de marcadores microssatélites para estudo da diversidade e fluxo gênico de *Manilkara maxima* T.D. Penn. (Sapotaceae) no sul da Bahia.** Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto. Co-orientadora: Deborah Maria de Faria. Co-orientador: Eduardo Mariano Neto.

A Mata Atlântica é considerada como uma das regiões mais biodiversas do mundo. Porém, tal característica não tem sido o bastante para evitar sua destruição. A região Sul da Bahia, apesar de conter a área melhor preservada da Mata Atlântica, onde os remanescentes florestais ainda abrigam diversas espécies arbóreas raras e endêmicas, também têm sofrido com ações antrópicas nas últimas décadas. *Manilkara maxima* T.D. Penn. (maçaranduba ou paraju) é uma espécie arbórea endêmica desta região, tendo suas populações reduzidas através da fragmentação de florestas, da perda de habitat e do corte seletivo, visto que as características anatômicas da espécie conferem alto interesse no mercado madeireiro. Tais processos tendem a reduzir a diversidade genética, pois podem afetar negativamente o fluxo gênico entre as populações existentes, o que pode acarretar em um aumento da endogamia e perda de alelos, afetando diretamente as próximas gerações. Atualmente, o conhecimento dos efeitos da fragmentação a nível genético nas populações remanescentes na Mata Atlântica tem sido possível através da utilização de técnicas moleculares. Dentre elas destaca-se a utilização de marcadores moleculares microssatélites (SSR), sendo intensamente utilizados, devido a sua natureza altamente polimórfica. Baseado nisso, o objetivo da presente pesquisa foi estimar a estrutura e diversidade genética em populações de *M. maxima* a partir de marcadores microssatélites específicos desenvolvidos para a espécie em estudo. Pensando nisso, a dissertação será apresentada em duas partes correspondentes a dois manuscritos científicos, sendo o primeiro baseado no desenvolvimento dos pares de *primers* SSR, caracterizados a partir de árvores adultas advindas da região sul baiana. Nessa etapa foi construída uma biblioteca genômica enriquecida para dinucleotídeos (AC)_n e (AG)_n, procedendo-se o sequenciamento através de NGS (*Next Generation Sequencing*). Posteriormente, a temperatura de anelamento e as condições para amplificação dos locos via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram otimizadas. A partir disso, foram obtidos dezessete locos polimórficos, com índices de

diversidade, exclusão de paternidade e probabilidades de identificação individual, relevantes para estudos populacionais. A segunda parte da pesquisa foi fundamentada na obtenção dos dados populacionais. Para isso, 144 indivíduos de *M. maxima* foram amostrados em três áreas de ocorrência da espécie na Mata Atlântica (Reserva biológica de Una, Fazenda Juerana e Fazenda Nova Angélica), todos localizados no sul do estado da Bahia. As informações sobre a genética descritiva foram analisadas por meio das estimativas de variabilidade sendo obtidas pelo número médio de alelos por locus, diversidade gênica, heterozigosidade observada e coeficiente de endogamia. Os resultados não indicam perda de variabilidade genética entre jovens e adultos, o que pode ser explicado considerando o tempo de resposta genética das populações frente às ações antrópicas. Uma vez que a espécie tomada como modelo biológico neste estudo possui um ciclo de vida longo, seriam necessárias muitas gerações para se detectar diferenças significativas nas estimativas dos parâmetros genéticos. Entretanto, os resultados de estrutura genética evidenciam a existência de duas populações distintas quanto ao *pool* gênico, mostrando que mesmo estando próximas geograficamente, as populações se comportam como distintas entre si. Por meio do teste de paternidade obtivemos dados sobre o fluxo gênico contemporâneo. Diagnosticamos dispersão de pólen e/ou semente em curtas distâncias. Houve fluxo gênico dentro dos três fragmentos estudado, e apenas entre os dois fragmentos com maior cobertura florestal de paisagem e que estão inseridos em unidades de conservação. Os resultados sugerem que a manutenção desses ambientes favorece a conservação da *M. maxima*.

Palavras-chave: Genética da conservação; Mata Atlântica; Next Generation Sequencing; SSR; Unidades de Conservação.

ABSTRACT

SILVA-JÚNIOR, José Audenor, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2016. **Characterization and applications of microsatellite markers to study the diversity and gene flow *Manilkara maxima* T.D. Penn. (Sapotaceae) in southern Bahia.** Advisor: Fernanda Amato Gaiotto. Advisor Committee Members: Deborah Maria de Faria and Eduardo Mariano Neto.

The Atlantic Forest is considered one of the most biodiverse regions of the world. However, this feature has not been enough to prevent its destruction. Although the southern region of Bahia contains the best preserved area of the Atlantic Forest, where forest remnants are still home to several rare and endemic tree species, it is also suffering with human activities in recent decades. *Manilkara maxima* T.D. Penn. (maçaranduba or paraju) is an endemic tree species with small populations under effects of forest fragmentation, habitat loss and selective logging due to its anatomical characteristics that confer high interest for the timber market. Such processes tend to reduce genetic diversity because they can affect the gene flow between populations increasing the inbreeding and lost of alleles, thereby affecting the future generations. The knowledge of the effects of fragmentation in the genetic diversity of the remaining tree populations has been possible using molecular techniques such as microsatellite markers (SSR) that have been frequently used due to their highly polymorphic nature. The objective of this study was to estimate the structure and genetic diversity in *M. maxima* populations using microsatellite markers specifically developed for this species. This thesis has been presented in two parts corresponding to two papers. The first, based on the development of SSR primers pairs, characterized from adult trees from the southern Bahia. We constructed a genomic library enriched for dinucleotide (AC)_n (AG)_n, which was sequenced by NGS (Next Generation Sequencing). Subsequently, the annealing temperature and the conditions for PCR (Polymerase Chain Reaction) were optimized. We obtained 17 polymorphic loci that allowed us to estimate diversity indices, paternity exclusion and individual identification odds useful for population studies. The second part of the research was based on the achievement of population genetic data. For this purpose, we sampled 144 *M. maxima* individuals in three areas (Reserva biológica de Una, Fazenda Juerana e Fazenda Nova Angélica), all located in the southern region of Bahia. Genetic diversity estimates were obtained based on average number of alleles per

locus, gene diversity, observed heterozygosity and inbreeding coefficients. Our results do not indicate loss of genetic variability between young and adult plants, which can be explained considering the time lag for genetic response in trees with a long life cycle. We believe that to detect significant differences in the genetic parameters estimations would take many generations and so a very long time. However, the genetic structure results demonstrated the existence of two distinct populations on the gene pool, showing that even when geographically close, the populations are becoming genetically distinct from each other. Through the paternity test we obtained data on gene flow. We diagnosed dispersion of pollen and / or seed over short distances. Gene flow was detected within each as the three fragments studied, and between only the two fragments with greater forest landscape cover, which are located in protected areas. Our results suggest that the maintenance of these environments favors the conservation of *M. maxima*.

Keywords: Genetic conservation; Atlantic forest; Next Generation Sequencing; SSR; Conservation units.

INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica é constituída por um complexo de formações florestais (Ombrófila Densa, Ombrófila Mista, Estacional Semidecidual, Estacional Decidual e Ombrófila Aberta), além da presença de campos de altitude, restingas e manguezais. Ela abriga uma grande parcela da biodiversidade do Brasil e do mundo. Seus altos níveis de riqueza biológica, além da elevada taxa de endemismo (Meyers et al., 2000), somados aos grandes índices de degradação, fizeram a Mata Atlântica ser considerada como um dos 34 *hotspots* de biodiversidade mundialmente conhecidos (Meyers et al., 2000; Martini et al., 2007; Laurance, 2009).

Originalmente, sua cobertura florestal se estendia por 17 estados em brasileiros, cobrindo entre 1.300.000 e 1.500.000 km², percorrendo o litoral do Rio Grande do Norte e indo até o Rio Grande do Sul. Sua extensão não se restringia apenas ao Brasil, seu domínio ia além das fronteiras, sendo diagnosticada a sua presença em outros países latinos, como Argentina e Paraguai (Morellato & Haddad, 2000). Atualmente, sua área está reduzida a cerca de 11,4% e 16% da vegetação original, divididos em pequenos fragmentos florestais, menores que 100 hectares (Ribeiro et al., 2009).

Essa subdivisão, reduz e isola ambientes favoráveis a sobrevivência das populações, modificando a dinâmica dos fluxos biológicos, podendo limitar o potencial das diversas espécies para a dispersão e colonização (Kageyama et al., 1998). Além disso, a fragmentação dos habitats pode antecipar a extinção e redução das populações de animais e plantas (Young, 1996; Leimu et al., 2006). Populações que outrora existiam em larga escala, quando divididas em duas ou mais subpopulações em áreas restritas, são mais vulneráveis à problemas associados com o tamanho reduzido da população como à depressão endogâmica e à perda da flexibilidade evolucionária (Kageyama et al., 1998).

Manilkara maxima T.D. Penn (Sapotaceae) é uma espécie arbórea ameaçada de extinção endêmica da região sul do estado da Bahia (O'Brien, 1998; Pennington, 1990), que possui grande importância econômica, além do seu considerável prestígio ecológico pois, participa de interações mutualísticas com espécies-bandeira também endêmicas e ameaçadas de extinção como o *Leontopithecus chrysomelas* (Mico-leão-dourado), uma “espécie carismática”, e o *Callithrix kuhlii* (Sagui-de-juba-preta) (Raboy et al., 2008; Oliveira, 2009), por essas considerações a espécie é tida como importante na conservação de remanescentes de Mata Atlântica.

A análise dos efeitos da diminuição e do isolamento de populações é de suma importância para prognosticar o futuro das diferentes espécies em áreas florestais fragmentadas, auxiliando na elaboração de planos efetivos em programas de manejos. Nesse aspecto, é fundamental utilizar-se de conceitos genéticos a fim de aumentar os conhecimentos acerca dos processos evolutivos e ecológicos (Storfer, 2007; Frankham 2008).

Atualmente, o conhecimento dos efeitos da fragmentação a nível genético nas populações remanescentes na Mata Atlântica tem sido possível através da utilização de técnicas moleculares (Santos, 2015; Ganzhorn et al., 2015). Dentre elas destaca-se a utilização de marcadores moleculares microssatélites (SSR), sendo intensamente utilizados, devido a sua natureza altamente polimórfica (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Borém & Caixeta, 2006). A utilização de tais ferramentas viabiliza a compreensão de fatos a respeito da dispersão e da variabilidade genética de indivíduos em diferentes remanescentes florestais.

Baseado nisso, o objetivo geral da presente pesquisa foi utilizar marcadores moleculares inéditos para avaliar a estrutura e diversidade genética de três populações de *M. maxima* localizados em diferentes fragmentos de Mata Atlântica, a partir de marcadores microssatélites específicos desenvolvidos para a espécie, com intuito de compreender sua dinâmica na floresta. A dissertação será apresentada em duas partes correspondentes a dois manuscritos científicos, sendo o primeiro, baseado no desenvolvimento dos pares de *primers* SSR, caracterizados a partir de árvores adultas advindas da região sul baiana, e o segundo fundamentado na diversidade e estrutura genética de *M. maxima* amostradas em três fragmentos florestais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Mata Atlântica e Unidades de Conservação

O domínio da Mata Atlântica é considerado como um dos biomas mais importantes em termos de diversidade biológica do mundo. É formado por um complexo de ecossistemas importantes, onde é diagnosticada a presença de cerca de 20.000 espécies de plantas destas, muitas espécies endêmicas e ameaçadas de extinção. Além das diversas espécies de vertebrados. Essa abundância em biodiversidade é superior ao que é encontrado em muitas outras regiões do mundo. Tal característica é relacionada com a sua grande extensão, sendo distribuída originalmente de norte a sul do país, com diferentes relevos, níveis pluviométricos e de altitude. Essas peculiaridades permitiram o desenvolvimento de diversas formações florestais e conseqüentemente diferentes habitats e nichos que servem de base para a grande diversidade de animais e plantas (Myers, et al., 2000; Freire et al., 2007; MMA, 20015).

A Mata Atlântica também desempenha um papel essencial para a conservação dos recursos hídricos. Sete das nove maiores bacias nacionais estão inseridas neste bioma, sendo este de suma importância na manutenção desses recursos, proporcionando qualidade e quantidade necessária para assegurar o abastecimento de milhares de brasileiros em inúmeras cidades. Além disso essas bacias fornecem recursos para diversas áreas economicamente ativas, que incluem o turismo, indústria, agricultura, pesca e geração de energia. Os fragmentos florestais remanescentes são extremamente úteis na manutenção do clima nas cidades, mitigando as altas temperaturas geradas pela intensa urbanização (Campanili & Schaffer, 2010).

A grande riqueza biológica somada ao intenso processo de destruição transformaram esse bioma em dos *hotspots* mundiais para a conservação. As ações antrópicas referentes ao início do processo de degradação desse bioma ocorrem desde o Brasil colonial, quando o pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) começou a ser extraído, sendo seguido de outros tipos de exploração, como a monocultura da cana-de-açúcar e o café, além do processo de expansão urbana e do desenvolvimento do setor agroindustrial (Galindo-Leal & Câmara, 2003). Todos esses ciclos econômicos levaram ao desmatamento inicial da parte litorânea do território. Posterior a isso, a devastação partiu para o interior do continente com a formação de cidades, sendo sua área original reduzida a aproximadamente entre 11,4% e 16% da área original (Ribeiro et al., 2009; Campanili & Schaffer, 2010).

Devido ao rápido processo de destruição, a Floresta Atlântica que anteriormente ocupava uma grande faixa terrestre, foi dividida em pequenos pedaços, por um grande número de ações antrópicas diferentes. No atual cenário, o bioma Mata Atlântica está fracionado em pequenos fragmentos florestais (Ribeiro et al., 2009). Essa condição interfere no dinamismo dos fluxos biológicos, modificando assim os índices de crescimento e perda populacional, interferindo no fluxo populacional e tendo como consequência a alteração da diversidade (Frankhan, 2008).

Contudo, tais efeitos de perda de diversidade e funcionalidade ecossistêmica podem ser reduzidos pela manutenção da conectividade entre os fragmentos florestais. Em plantas, devido ao hábito séssil, esse processo é limitado sendo na maioria das situações auxiliado por vetores de dispersão. Muitos dos fragmentos florestais existentes são menores que 50 ha, porém em alguns desses ainda há certo nível de conexão, proporcionando a manutenção de um certo número de várias espécies. A conservação das espécies pertencentes a este bioma estará sujeita à criação de áreas de proteção à natureza, além da expansão das áreas que já são protegidas (Ribeiro et al., 2009).

Essas áreas são denominadas como Unidades de Conservação (UC), as quais possuem como objetivo principal a proteção dos recursos naturais ao longo do tempo, permitindo a manutenção das diversas populações da fauna e flora, habitats e ecossistemas. São classificadas em dois grupos: UC de tempo integral e UC de uso sustentável. A primeira tem como propósito a conservação da biodiversidade, não sendo permitida caça ou extração vegetal, reservada para fins educativos e pesquisas científicas. Já no segundo tipo de unidade é permitida a utilização do ambiente natural de diversas maneiras, com a conservação da biodiversidade sendo mantida (MMA-SNUC, 2011).

Mata Atlântica do sul da Bahia

A região do Sul da Bahia, que está inserida no Corredor Central da Mata Atlântica, destaca-se pela sua alta riqueza biológica e elevado grau de endemismo, sendo considerada a área mais importante da Região Nordeste (Martini et al., 2007), onde é registrada a incidência de mais de 400 espécies de árvores por hectare. Esta região é superior as outras áreas de Mata Atlântica no Brasil em termos de densidade, sendo também um dos sítios que possuem maior número de espécies arbóreas no Mundo. Além disso, abriga mais de 50% dos primatas deste

bioma, além do alto número de espécies endêmicas de insetos, anfíbios e aves (Pinto, 1997; Thomas et al., 1998; Silva et al., 2004; Aguiar et al., 2005; Ayres et al., 2005).

Quando comparada as outras áreas de Mata Atlântica do país, a região Sul da Bahia foi a que permaneceu conservada por mais tempo. Porém, vários ciclos econômicos sucederam-se em seus domínios acarretando o processo de destruição do bioma. Em especial, a abertura da BR-101 no extremo sul baiano proporcionou um acentuado processo de devastação da floresta pela prática do desmatamento. Em pouco tempo a floresta original foi drasticamente modificada, restando apenas poucos fragmentos (Galindo-Leal & Câmara, 2005; Tabarelli & Gascon, 2005).

Já na região cacaueteira, ou região sul, houve implementação do cultivo do cacau imerso na floresta, em um sistema agroflorestal conhecido como “cabruca”, onde as árvores de grande porte da Mata Atlântica fornecem o sombreamento utilizado no desenvolvimento das roças de cacau. Esse sistema favoreceu a conservação de várias espécies arbóreas da região (Sambuichi, 2002). Contudo, a disseminação da vassoura-de-bruxa nas lavouras cacaueteiras, aliada a queda do valor do cacau no mercado internacional, levou a grande crise dessa cultura na região. Esse cenário econômico foi responsável pelo aumento da exploração madeireira, tanto das cabrucas quanto dos fragmentos florestais, promovendo o corte seletivo de diversas espécies arbóreas (Alves, 2006).

Por outro lado, alguns fragmentos por estarem estabelecidos nas regiões de tabuleiros e em terras litorâneas, foram considerados inapropriados para a agropecuária, além de estarem localizados em áreas de difícil acesso. Desse modo, estes fragmentos permaneceram inexplorados, possibilitando a conservação de várias espécies que necessitam de amplas regiões de mata, além daqueles que são capazes de permear as áreas variegadas, como as encontradas no município de Una (Mariano-Neto, 2004; Pardini et al., 2009).

Muitas dessas espécies arbóreas que conseguiram sobreviver nesses fragmentos, são tidas como “espécies chaves” para a manutenção da biodiversidade, uma vez que fornecem recursos para a conservação de outras espécies, como frutos e ambientes de permanência durante a inatividade noturna. Uma delas é *Manilkara maxima*, que fornece fruto para a alimentação do Mico-leão-da-cara-dourada e o néctar das suas flores serve como alimento para o sagui-da-juba-preta (Raboy et al., 2008; Oliveira, 2009)

***Manilkara maxima* T.D. Penn.**

Manilkara maxima T.D. Penn. é uma espécie arbórea pertencente à família Sapotaceae, sendo popularmente conhecida como “maçaranduba” ou “parajú”. É característica de florestas maduras e bem preservadas, contudo pode ser encontrada em fragmentos florestais como resíduo da floresta matriz original, sendo endêmica e nativa da Floresta Atlântica do sul da Bahia. É encontrada preferencialmente em áreas de restinga, sendo também presente ao norte do rio Jequitinhonha, em florestas de terras baixas (Pennington, 1990; Mariano-Neto, 2004).

A espécie é representada por árvores de grande porte, robustas, podendo chegar a 30m de altura e 100 cm de diâmetro. Possui flores brancas, consideravelmente maiores que as demais espécies do gênero (Pennington, 2006), somente demonstrando proximidade à *M. longifolia*, que também possui flores grandes. Ambas se diferenciam porque *M. maxima* possui folhas com formato obovado e cor marrom avermelhada na porção abaxial e flores reunidas em fascículos, enquanto *M. longifolia* possui folhas pilosas e flores solitárias. Além disso, *M. maxima* possui casca interna avermelhada, com látex branco em abundância (Pennington, 2006). Seus frutos têm coloração marrom quando maduros, sendo consumidos por primatas como o Mico-leão-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (Oliveira, 2009). A madeira é firme, com a parte interior do tronco em vermelho escuro. Com longevidade natural, possui resistência ao cupim, sendo considerada como ótima para a construção civil para confecção de cercas e coberturas das casas, o que desperta interesse na indústria madeireira, tendo um alto valor econômico agregado, levando assim a prática de corte seletivo e, conseqüentemente, diminuição da quantidade de indivíduos nas populações (Gonzaga, 2006).

Esta espécie distribui-se em uma região fragmentada e com declínio constante na qualidade do habitat devido à intensa expansão imobiliária em áreas de restinga e pela presença de áreas de cabruca, sendo classificada como espécie vulnerável na lista vermelha da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) (O’Brien, 1998). *M. maxima*, bem como as outras espécies do gênero, possui uma alta relação e interatividade com a fauna. Espécies do gênero *Manilkara* podem ser polinizadas por abelhas, morcegos, pássaros e primatas como o Sagui-da-juba-preta (*Callithrix kuhlii*) (Pennington, 2006; Azevedo et al., 2007; Raboy et al., 2008).

Diversidade e estrutura genética

A diversidade genética é primordial para a sobrevivência das espécies e para a conservação das suas populações no decorrer do tempo. A variabilidade genética é importante

pois possibilita que populações possam se adaptar as possíveis alterações do ambiente. Indivíduos com certos arranjos alélicos podem possuir exatamente os caracteres fundamentais para sobreviver e procriar em novas condições (Frankhan, 2008).

Dentro das diversas populações, as frequências alélicas podem variar consideravelmente (Sole-Cava, 2001). Em pequenas populações, essas frequências podem ser diferentes de uma geração para outra, de modo aleatório, dependendo somente do acasalamento e reprodução dos indivíduos (deriva genética) (Young et al., 1996). As variações são inseridas por mutação, reprodução sexuada ou migração de indivíduos de outras populações e reduzidas pela deriva genética, pela seleção e pelo endocruzamento (Nei, 1987). A perda de variabilidade genética em uma população pequena pode limitar a habilidade da população em conviver com as mudanças do ambiente a longo prazo, tais como poluição, novas doenças ou mudança climática global (Allendorf & Leary, 1986).

As estimativas da variabilidade genética nas populações podem ser obtidas pelo nível de heterozigosidade esperada nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E), número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_O) e índice de fixação (f). O número de heterozigotos é um dado informativo sobre a diversidade genética, já que os indivíduos heterozigotos possuem alelos diferentes (Wright, 1965).

O nível da estrutura genética entre e dentro populações é uma maneira de caracterizar a diversidade genética, sendo que esses dados podem servir de subsídios em estratégias de conservação genética (Ridley, 2006). A estrutura genética é compreendida como a maneira em que alelos e genótipos estão distribuídos no ambiente, sendo que quando indivíduos mais similares geneticamente agrupam-se em uma determinada população, divergindo-se de outras isoladas ou distantes, dizer-se que essa população está estruturada geneticamente. Este fenômeno é resultado da ação de forças evolutivas que atuam em cada espécie, de acordo com as oscilações do ambiente (Hamrick, 1992). Assim, diz-se que populações estruturadas geneticamente divergem entre si do ponto de vista genético. As estatísticas-F de Wright são os parâmetros mais eficazes na análise da estrutura genética (Wright, 1965; Pearse & Crandall, 2004). A geração de um volume maior de informações sobre diversidade genética é possível a partir da utilização de ferramentas moleculares, através de marcadores genéticos associados a ferramentas computacionais.

Marcadores microssatélites

Os marcadores de DNA são ferramentas moleculares poderosas, pois agem diretamente no nível de DNA. Como geralmente são desprovidos da influência ambiental, são ilimitados, e aptos a serem utilizados em vários procedimentos, como estudo de diversidade genética, mapeamento e análise de genes (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Porém, em ecossistemas com elevada diversidade de espécies, como a Mata Atlântica, é quase impraticável analisar geneticamente todas elas, fazendo-se necessário a definição de espécies modelos. Esse diagnóstico disponibilizará progressos na compreensão genética em populações naturais de espécies arbóreas, colaborando no desenvolvimento de padrões para o monitoramento de ações na Mata Atlântica (Kageyama et al., 1998)

O uso da biologia molecular como ferramenta nos projetos de conservação tem permitido uma enorme eficiência. No momento presente, uma série de marcadores moleculares tem sido caracterizada por meio de práticas que possibilitam uma vasta discriminação do polimorfismo genético presentes em plantas (Kageyama et al., 2003). Os marcadores microssatélites proporcionam uma das maneiras mais práticas e poderosas disponíveis para acessar a diversidade genética em espécies ameaçadas. O termo microssatélite foi proposto pela primeira vez em 1989, em trabalhos realizados em genes de células do músculo cardíaco (Litt & Luty, 1989). Sequências simples repetidas (SSRs), também chamada de regiões microssatélites, são regiões do DNA com unidades de repetições entre 2 e 7 pares de base (pb) de comprimento (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Presumivelmente, estas repetições aparecem por meio de mutações causadas pelo escorregamento da DNA polimerase durante a síntese da nova fita de DNA na fase S do ciclo celular, ou pelo alinhamento errôneo das fitas de DNA resultando em recombinação desigual (Levinson & Gutman 1987; Oliveira et al., 2006). Desta forma, um polimorfismo alélico em um loco SSR ocorre devido a modificações na quantidade de repetições. Estes marcadores são visualizados após a amplificação de DNA utilizando *primers* (iniciadores) que flanqueiam as repetições e os amplicons podem ser visualizados através de eletroforese.

Para a obtenção destes marcadores, o método mais comumente usado baseava-se em cinco passos: (1) Construção de uma biblioteca genômica enriquecida; (2) *screening* por “rastreamento” da biblioteca por hibridização com sondas contendo o motivo repetido; (3) Determinação das sequências dos clones positivos; (4) Desenho dos *primers* para amplificação via reação da polimerase em cadeia (PCR) do loco específico; (5) Análise da PCR e identificação dos polimorfismos. Os fatores limitantes a utilização desta abordagem são: o

elevado o custo da técnica ao final do processo, além da intensiva mão de obra, exigindo profissionais qualificados (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Porém, houve uma rápida evolução no desenvolvimento de marcadores moleculares específicos, com o advento do sequenciamento de próxima geração (NGS – *Next Generation Sequencing*), comercializado desde 2005. Essas novas tecnologias podem gerar muito mais quantidade de informação que o sequenciamento clássico de Sanger (Sanger & Nicklen, 1977), diminuindo o custo e o tempo por nucleotídeo sequenciado (Shendure & Ji, 2008). Esse processo, acontece pela clonagem de DNA in vitro e por possuir sistemas de suporte sólido para os itens de sequenciamento, evitando o trabalho laboratorial massivo como a geração de clones bacterianos e a confecção manual das placas para sequenciamento (Grada & Weinbrecht, 2013).

Mesmo possuindo diferentes abordagens de sequenciamento, de modo geral, as plataformas de NGS possuem três etapas comuns: (1) Preparação das amostras; (2) Amplificação; (3) Sequenciamento. Inicialmente fragmenta-se o DNA, por um procedimento químico, enzimático ou mecânico (Shendure & Ji, 2008; Egan, 2012). Em seguida, adaptadores, que são sequências sintéticas já conhecidas, são unidas aos fragmentos. Depois disso, as amostras passam pelo processo de amplificação, sendo em seguida, sequenciadas por síntese. Neste último processo, a leitura é iniciada pelos adaptadores sendo as amostras computacionalmente separadas (Shendure & Ji, 2008). A probabilidade de cada base encontrada ser a correta é calculada pelo “Phred Quality Score”. A partir disso, as sequências contendo regiões repetidas simples são detectadas por bioinformática e os *primers* específicos são desenhados para flanquear as regiões de interesse (Grada & Weinbrecht, 2013).

Por serem de natureza codominante, os microssatélites são usados de modo mais frequente em estudos populacionais, permitindo análises baseadas em frequências alélicas, podendo ser utilizados também em estudos de dispersão em plantas, estrutura genética e parentesco (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

CAPÍTULO 1

Molecular Biology Reports – Artigo aceito

Qualis A2: Ciências Agrárias

Fator de Impacto: 2.024

Development of microsatellite markers for *Manilkara maxima* TD Penn (Sapotaceae) and their use in conservation genetics

José Audenor Silva-Junior¹, Daniele de Souza França², Ramiris César Souza Moraes³,
Fernanda Amato Gaiotto¹⁻²⁻⁴

¹Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) Rodovia Ilhéus-Itabuna km 16 s/n, Salobrinho 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brazil;

²Laboratório de Marcadores Moleculares, Centro de Biotecnologia e Genética, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Ilhéus-Itabuna km 16 s/n, Salobrinho 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brazil.

³Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) Rodovia Ilhéus-Itabuna km 16 s/n, Salobrinho 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brazil;

⁴Corresponding author: gaiotto@uesc.br

ABSTRACT

Purpose

Manilkara maxima is an endemic tree species of the Atlantic Forest in southern Bahia, Brazil. It is considered important for forest conservation due to its mutualistic interactions with endemic and endangered animals. Our aim was to develop microsatellite markers to estimate genetic diversity in order to provide information for effectiveness of future conservation programs

Materials and Methods

We used next generation sequencing technology to develop the first specific microsatellite markers for *M. maxima*. Seventeen new microsatellite loci were applied in 72 individuals sampled in three natural populations.

Results and Discussion

On average, the number of alleles per loci was 8.8. The expected heterozygosity varied between 0.72 and 0.77, indicating that the developed set of molecular markers is useful for genetic diversity studies. Additionally, the estimated value for the combined probability of exclusion (Q) was greater than 0.999, which indicates the powerful of these molecular tools for paternity and kinship analysis.

Conclusion

Our results demonstrate that the set of microsatellites developed in this work is a powerful tool for population genetics, molecular ecology and conservation biology purposes in tree species of tropical regions.

Keywords: Conservation; Tropical Forest; SSR; Population Genetics; Molecular Markers; NGS

Introduction

Manilkara maxima T.D. Penn is a member of the Sapotaceae family, endemic of Atlantic Forest of Bahia, Brazil, and popularly known as “maçaranduba” [1]. It is classified by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) as a vulnerable species [2] due to human activities, such as selective logging [3] driven by the high value of its wood. *M. maxima* has several ecological interaction like seed and pollen dispersal with endangered animals like golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) and wied’s marmoset (*Callithrix kuhlii*) [4, 5]. For these reason, it is considered an ecosystem integrity indicator, and can be classified as target species for the *in situ* conservation of forest genetics resources [4]. Therefore, the knowledge of genetic diversity of this species can be useful in assessing the effects of human activities on tropical forest ecosystems and also helpful to design effective conservation strategies.

Simple sequences repeats (SSR) or microsatellites are one of the most used molecular markers in population genetic studies. Due to its characteristics (codominant, polymorphic, abundant on angiosperm genomes), it is considered a helpful tool in understanding parameters related to population structure, genetic diversity, gene flow and dispersal within and between natural populations, which are important for conservation practices [5].

Azevedo et al. [6] developed 12 microsatellite loci for *Manilkara huberi* (Ducke). Ganzhorn et al. [7, 8] transferred five of them to *Manilkara maxima* in order to study the spatial genetic structure [7] and the influence of the size and shape of fragments on the density and genetic diversity [8]. The advantage to transfer molecular markers among congener species is shortening steps, and consequently decreasing time and cost to obtain the results instead developing new primers. However, the success in transferability will depend on how evolutionary close are the species [9]. Additionally, the microsatellite markers developed for one species can show lower genetic diversity for the transferred species due to the presence of null alleles or other molecular procedure instead the biological reason [10,11].

Considering the importance of this molecular tool for effectiveness of conservation, our aim was to report the first 17 microsatellite markers for *M. maxima*. Additionally we made a preliminary evaluation on genetic diversity of three populations.

Materials and methods

Development of the primers, PCR amplification and genotyping

Species-specific microsatellite primers pairs were developed using Next Generation Sequencing (454 pyrosequencing technology, Ecogenics GmbH, Schlieren, Switzerland). We used DNA from fresh leaves of a single adult individual of *M. maxima* to construct a genomic library enriched with probes (AC)_n and (AG)_n, this approach increases the chances of finding microsatellites. We generated a total of 1824 sequences ranging between 80 and 280 base pairs. From those we used the 167 larger sequences for primers design. Forty seven primers pairs were synthesized but seventeen showed positive amplification patterns on electrophoretic analysis. The primer sequences, GenBank accession numbers and some loci characterization are described in Table 1.

For genomic DNA amplification the polymerase chain reaction (PCR) was performed with a final volume of 13 µL containing 1.3µl 10 x buffer, 3.25 mM dNTPs, 9.75mM MgCl₂,

3.25mg BSA (bovine serum albumin) (Sigma), 1U *Taq* DNA polymerase (Phonetrutria, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), 3.9 mM forward and reverse primers, 1.43 mM tail-complementary forward primer labeled with fluorochromes (6-FAM, VIC, PET, or NED, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and 7.5 ng template DNA.

The amplifications occurred on thermocycler Veriti® (Applied Biosystems) following the PCR program: 94 ° C for 1 min, followed by 30 cycles of 94 for 45 seconds, annealing temperature specific for each primer pair for 45 seconds, 72 ° C for 45 seconds, followed by 10 cycles of 94 ° C for 1 minute, 53 ° C for 45 seconds 72 ° C for 45 seconds, and a final extension of 72 ° C for 5 minutes. The final PCR products were submitted to a multiload electrophoresis system in a capillary ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

We proceed the genotyping using GeneMapper® software (Applied Biosystems).

The 72 tree samples were obtained from three different sites in Una - Bahia – Brazil: Juerana Farm (15°12'45''S, 39°08'31''W), Private Reserve of Natural Heritage - RPPN Nova Angélica (15°15'03''S, 39°04'51''W) and Una Biological Reserve (Rebio) (15°11'37''S, 39°03'38''W). The genomic DNA was extracted from approximately 200 mg of fresh leaves through CTAB protocol [12].

Data analysis

The number of alleles per locus (*A*), observed heterozygosity (*H_o*) and expected heterozygosity (*H_e*) was estimated using the CERVUS software, version 3.0.3 [13]. To estimate the linkage disequilibrium (*LD*) we use FSTAT software, version 2.9.3.2 [14] and the departure from Hardy-Weinberg equilibrium was estimated by GenAlex 6.4 [15].

Results and Discussion

The main advantage to develop specific microsatellite markers is to increase the accuracy of the population genetics parameters estimation [10]. Therefore, we developed 17 SSR primer pairs, amplifying an average of 8.82 alleles per locus. The primers are specific for *M. maxima* and their characteristics are described in table 2. All loci had different characteristics considering the three populations analyzed. Their power to detect genetic variation within and between populations is evident, because the loci were polymorphic, with an average of (8.82; 8.76; 8.88) per locus. The Mmax438 loci (Juerana farm), Mmax833 loci (Rebio) and Mmax4460 loci (RPPN - Nova Angelica) were less informative. However, Mmax2124 loci were the most polymorphic for two populations (Juerana farm and Rebio). For Nova Angelica population the locus Mmax503 were that which shows the largest genetic diversity estimations (Table 2). These new microsatellites have different repeat motifs. We did not detect a correlation between the polymorphic level and the length of motifs. Analyzing all loci we did not find any pairs with significant linkage disequilibrium. The combined exclusion values (*Q*) and the combined estimation values (*I*) (Table 2) confirm the powerful of these molecular tools for future paternity and individual identification analyzes additionally to population genetics studies.

Therefore the development of species-specific microsatellite markers can avoid misinterpretation of biological meaning [10]

The 17 microsatellite markers developed in this study have high potential to be used as molecular tools to support population and ecological issues, helping the management and the

development of conservation genetic strategies for this important timber species from Brazilian Atlantic Forest.

Acknowledgements We thank Horlei Ribeiro, Rodrigo Bezerra, Daniela Borges and Jiomário Souza, for supporting on field and lab. This work was funded by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - SISBIOTA# 563216/2010-7) / FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) (PRONEX#PNX0014/2009). We also thank FAPESB for scholarship to JASJ and CNPq for research fellowship for FAG.

References

1. Pennington TD (1990) Flora Neotropica (Sapotaceae). Dissertation nº52, Organization for Flora Neotropica by the New York Botanical Gardens.
2. O'Brien JP (1998) *Manilkara maxima*. In: IUCN 2012. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. www.iucnredlist.org. Accessed on 25 August 2015.
3. Pennington TD (2006) Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Sapotaceae. *Rodriguésia* 57: 251–366.
4. Oliveira LC, Hankerson SJ, Dietz JM, Raboy BE (2010) Key tree species for the golden-headed lion tamarin and implications for shade-cocoa management in southern Bahia, Brazil. *Anim Conserv* 13: 60–70.
5. Kageyama PY, Perecim MB, Vencovsky R (2003) Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Sci For* 64: 93–107.
6. Azevedo V, Vinson C, Ciampi A (2005) Twelve microsatellite loci in *Manilkara huberi* (Ducke) standal (Sapotaceae), na Amazonian timber species. *Mol Ecol Notes* 5: 13–15.
7. Ganzhorn SM, Thomas WW, Gaiotto FA, Lewis JD (2015) Spatial genetic structure of *Manilkara maxima* (Sapotaceae), a tree species from the Brazilian Atlantic forest. *J Trop Ecol* 31: 437–447.
8. Ganzhorn S, Perez-Sweeney B, Thomas W, et al. (2015) Effects of fragmentation on density and population genetics of a threatened tree species in a biodiversity hotspot. *Endanger Species Res* 26:189–199. doi: 10.3354/esr00645
9. Steinkellner H, Lexer C, Glössi J (1997) Conservation of (GA)_n microsatellite between *Quercus* species. *Mol Ecol* 6: 1189–1194.
10. Ellis JR, Burke JM (2007) EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity (Edinb)* 99:125–132. doi: 10.1038/sj.hdy.6801001.
11. Kindiger B (2006) Cross-species amplification of *Lolium* microsatellites in *Poa* ssp. *Grassland Sci* 52:105–115.
12. Doyle JJ and Doyle JS (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
13. 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.
14. Goudet J (1995) FSTAT: A computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86: 485–486.

15. Peakall R, Smouse PE (2006) GENEALX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288–295.

Table 1: Description of 17 *M. maxima* microsatellite loci

Locus	GenBank ID	Primer Sequence 5' - 3'	Repeat Motif	Ta (°C)	Size Range (pb)
Mmax 435	KT194194	F: CACATGATTAGCTCGTGCCC R: TACTTTGGGAGACAGGTGGC	(CA)11	58	236-268
Mmax 438	KT194195	F: ACCGCACAGTTATCCAAGATG R: TGAATGTCCTACCACATCCTCTC	(AG)17	56	156-200
Mmax 503	KT194196	F: TGTACATAACGTGTGGAGGGG R: TAGGGTGGCCAAGTGATCTG	(GAGT)12(GA)11	57	142-192
Mmax 665	KT194197	F: GCGCGACAATTTTATCATGTCTG R: CCCTCGGCCAGTCTTATTC	(AC)15	57	232-252
Mmax 833	KT194198	F: CTTGCTGCAGTGGATTCTGG R: TCACTGCGATTCCCCTCTTG	(GA)12	56	244-296
Mmax 2124	KT194199	F: CAGTCTGCTGGCTGCAATAG R: TTCTGGAGCAGTTTCTTGGG	(AC)17	55	220-278
Mmax 2697	KT194200	F: ACAAGCTTCTTAAACGTGAACAG R: CTCTGGAGTTCCTGACCCAC	(AC)12	56	184-210
Mmax 3263	KT194201	F: TCTGTCACTATTCAGGGAACC R: CAAATCCTCTACTGCTCGCC	(GA)15	56	222-248
Mmax 3319	KT194202	F: GGTGTATGACTTGTGGTGGC R: CTACGGCTCTGATAACCACC	(GT)13	56	174-220
Mmax 3599	KT194203	F: CAACCTGGGTGGGAGGTAAG R: ATTCGCAAGCTCGATAGCAC	(AG)15	56	182-206
Mmax 3618	KT194204	F: TGTACATCGTCAGTGGTGGG R: GGCCTTTGTAGCCATTGTCC	(AG)20	48	230-256
Mmax 4460	KT194205	F: TGCTCAGTAGACGAGCTTCC R: ATGGCCTTCGCAATGTGTTC	(AC)13	56	176-230
Mmax 4795	KT194206	F: TTCTCCCGAAAGGTCCGATG R: TTAATTGGGCTGTCTGTCCG	(AC)12	56	236-328
Mmax 4990	KT194207	F: TCACTACTTGGAGTGC GTTC R: AAGAGAACA AACTGGCAGCG	(AG)12	56	190-230
Mmax 5351	KT194208	F: AGCAACCCTGAACGTCTCTC R: TCTGAAACAGAACCATGCATCC	(AC)15	56	224-278
Mmax 11580	KT194209	F: ACCATTTCAAGGAAGGAATCTCG R: TGGAATATCTCCGCCACCG	(TG)17	56	248-270
Mmax 15598	KT194210	F: TTGGGGGCATCCAAGGTTAG R: AGTCATTGTAGCCTCTTGGC	(GA)17	56	112-154

Table 2: Genetic characterization of 17 SSR loci in three populations of *M. maxima*

Locus	Juerana Farm (15°12'45''S, 39°08'31''W)						RPPN Nova Angélica (15°15'03''S, 39°04'51''W)						Reserva Biológica de Una (15°11'37''S, 39°03'38''W)						HWE
	A	H _O	H _E	Q	I	F	A	H _O	H _E	Q	I	F	A	H _O	H _E	Q	I	F	
Mmax 435	7	0.571	0.688	0.667	0.14	0.172	11	0.478	0.867	0.873	0.04	0.454	7	0.625	0.8	0.778	0.077	0.217	*
Mmax 438	3	0.458	0.451	0.295	0.392	-0.016	6	0.227	0.781	0.731	0.093	0.714	11	0.583	0.8	0.822	0.059	0.3	*
Mmax 503	16	0.792	0.867	0.881	0.038	0.089	14	0.792	0.894	0.912	0.027	0.116	11	0.636	0.9	0.858	0.046	0.257	*
Mmax 665	5	0.625	0.706	0.622	0.148	0.117	8	0.667	0.854	0.849	0.047	0.223	6	0.591	0.8	0.719	0.103	0.219	ns
Mmax 833	9	0.591	0.671	0.661	0.147	0.122	5	0.435	0.505	0.43	0.303	0.142	5	0.292	0.6	0.558	0.192	0.548	ns
Mmax 2124	20	0.87	0.938	0.957	0.012	0.075	11	0.417	0.749	0.774	0.089	0.449	14	0.609	0.9	0.923	0.023	0.333	*
Mmax 2697	7	0.792	0.809	0.776	0.074	0.021	8	0.667	0.727	0.743	0.103	0.085	6	0.636	0.7	0.662	0.127	0.135	ns
Mmax 3263	8	0.708	0.743	0.727	0.103	0.048	10	0.667	0.66	0.681	0.142	-0.001	11	0.7	0.9	0.86	0.044	0.19	ns
Mmax 3319	9	0.917	0.824	0.818	0.06	-0.115	8	0.583	0.614	0.612	0.184	0.052	10	0.833	0.8	0.795	0.069	-0.026	ns
Mmax 3599	9	0.792	0.862	0.859	0.043	0.083	11	0.792	0.809	0.814	0.065	0.021	9	0.792	0.7	0.695	0.136	-0.186	ns
Mmax 3618	7	0.429	0.715	0.733	0.098	0.448	9	0.773	0.864	0.866	0.042	0.108	8	0.773	0.8	0.809	0.064	0.058	*
Mmax 4460	13	0.625	0.86	0.906	0.028	0.302	4	0.583	0.444	0.324	0.383	-0.322	6	0.833	0.7	0.593	0.167	-0.227	ns
Mmax 4795	4	0.917	0.524	0.469	0.237	-0.497	9	0.958	0.686	0.625	0.155	-0.409	12	0.833	0.8	0.826	0.059	-0.011	*
Mmax 4990	5	0.417	0.419	0.425	0.334	0.084	8	0.455	0.799	0.791	0.072	0.437	8	0.542	0.6	0.576	0.207	0.08	*
Mmax 5351	14	0.875	0.884	0.931	0.02	0.042	10	0.542	0.822	0.823	0.059	0.346	12	0.583	0.9	0.885	0.036	0.334	*
Mmax 11580	10	0.864	0.74	0.787	0.078	-0.111	10	0.833	0.777	0.791	0.077	-0.074	9	0.583	0.7	0.707	0.126	0.156	ns
Mmax 15598	4	1	0.546	0.496	0.218	-0.607	7	0.958	0.774	0.744	0.091	-0.245	6	0.958	0.7	0.648	0.136	-0.348	*
Mean	8.82	0.973	0.72	0.999 ^a	8.23x 10 ^{-19a}	0.03	8.76	0.9804	0.74	0.999 ^a	1.59 x 10 ^{-18a}	0.146	8.88	0.9681	0.77	0.999 ^a	3.89 x 10 ^{-19a}	0.128	-----

A – Number of alleles; H_O – Observed heterozygosity; H_E – Expected heterozygosity; Q – Probability of paternity exclusion; I – Identity index; HWE – Hardy-Weinberg Equilibrium; F – Fixation index; ^a- Combined values; ns = not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

CAPÍTULO 2

Análises genéticas revelam a importância de unidades de conservação para a manutenção da diversidade de espécie arbórea tropical.

José Audenor Silva Júnior¹; Ramiris César Souza Moraes²; Deborah Maria de Faria²; Fernanda Amato Gaiotto^{1,2,4}

¹Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) Rodovia Ilhéus-Itabuna km 16 s/n, Salobrinho 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brasil;

²Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) Rodovia Ilhéus-Itabuna km 16 s/n, Salobrinho 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brasil;

³Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Biotecnologia e Genética, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Ilhéus-Itabuna km 16 s/n, Salobrinho 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brasil;

⁴Corresponding author: gaiotto@uesc.br

Resumo

Os efeitos da fragmentação de habitat podem levar a estrutura genética nas populações. Neste sentido, a criação e manutenção de unidades de conservação (UC) são importantes para a conservação da diversidade genética. Nesta pesquisa, foram analisadas as consequências da fragmentação e do corte seletivo em três populações de *Manilkara maxima* T.D.Penn. (Sapotaceae), uma importante espécie florestal ameaçada de extinção, endêmica da Mata Atlântica do Sul da Bahia, Brasil. Foram amostrados 144 indivíduos, em três áreas distintas de floresta, sendo uma delas UC de proteção integral. Os dados genéticos foram obtidos por meio de dezessete marcadores microssatélites específicos. Apesar dos índices genéticos descritivos não apresentarem diferenças significativas entre as populações, notou-se a presença de três grupos genéticos distintos nos adultos e dois nos jovens, indicando estrutura genética nesses grupos. Além disso, índices de migração foram identificados, sendo observado em maior número na população amostrada dentro de uma UC de proteção integral. Entre a população da REBIO (População 1) e RPPN Nova Angélica (População 2) houve identificação de fluxo gênico, já na população da Fazenda Juerana (População 3) houve somente fluxo gênico dentro do fragmento. Nossos resultados para *M. maxima* indicam que a manutenção de Unidades de

Conservação favorece a manutenção da diversidade genética da espécie, além de conservar outras espécies ecologicamente relacionadas a esta arbórea ameaçada.

Palavras-chave: Floresta Tropical; Genética da conservação; *Manilkara maxima*; Marcadores moleculares.

1. Introdução

As UCs são áreas ambientais com características naturais relevantes, reconhecidas como ferramentas de conservação da biodiversidade, portanto a criação de novas unidades e a manutenção das existentes têm por objetivo a minimização dos impactos da exploração dos ecossistemas brasileiros, preservando o patrimônio genético existente (Rylands & Brandon, 2005).

Historicamente, a Mata Atlântica brasileira vem sofrendo um intenso processo de degradação pelos sistemas de exploração e uso da terra. Desde o período colonial, esse bioma tem seu domínio modificado, o que vem ocasionando a extinção de diversas espécies. Por ser rica em biodiversidade e estar inserida em um cenário de alteração do ambiente natural, a Mata Atlântica é considerada um dos 34 *hotspots* mundiais para conservação (Mittermeier, 1998; Myers, 2000; Martini et al., 2007; Laurance, 2009; Ribeiro et al., 2009). A vasta alteração das paisagens naturais bem como das relações ecológicas existentes têm sido resultante dos processos de perda e fragmentação de habitats ocasionado pelas intensas perturbações antrópicas.

A diversidade genética é de suma importância para a conservação e manutenção das espécies, já que provê recursos para a adaptação, evolução e consequente sobrevivência de populações naturais (Kageyama et al., 1998; Moraes, 2005; Hardy et al., 2006). A fragmentação de florestas é potencialmente perigosa para as populações que se tornam subdivididas, uma vez que podem ocorrer perdas genéticas e, em situações extremas, a extinção de espécies (Young et al., 1996; Tabarelli & Gascon, 2005; Leimu, 2006). Com a fragmentação florestal, ocorre uma redução do tamanho das populações e, portanto, há uma diminuição da diversidade genética, levando ao isolamento e vulnerabilidade aos eventos estocásticos (Ouborg, 1993; Rajora & Mosseler, 2001). Essa modificação da variabilidade genética e isolamento podem estruturar geneticamente as populações nesses ambientes.

Tanto a diversidade entre os fragmentos pode ser mantida, quanto as características negativas da fragmentação, podem ser minimizadas, pela manutenção da conectividade entre as populações (Bacles & Jump 2011). Desse modo, além da preservação dos ambientes florestais, a conectividade pode proporcionar o fluxo gênico entre as populações das diversas espécies, minimizando o endocruzamento e auxiliando na diminuição do processo de estrutura genética (Coulon, 2004). Várias pesquisas empregando ferramentas genéticas têm sido feitas para auxiliar nas estratégias conservacionistas em populações naturais de espécies arbóreas (Storfer, 2007; Santos et al., 2015; Ganzhorn et al., 2015).

Montagna et al. (2012a), estudando por meio de isoenzimas as populações de *Dicksonia sellowiana*, uma pteridófita, nativa da Mata Atlântica e característica da tipologia Floresta Ombrófila Mista, em Santa Catarina, observou que populações que estavam inseridas em áreas de UC possuíam uma diversidade genética maior do que aquelas que não se encontravam em áreas de conservação. Em pesquisa similar, utilizando *Araucaria angustifolia* como modelo biológico, o mesmo autor chegou as mesmas conclusões, demonstrando que as populações em UC se diferenciam de outras localizadas fora dessas unidades (Montagna et al., 2012b).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estimar a estrutura e a diversidade genética de populações de *Manilkara maxima* em remanescentes de Mata Atlântica, dentro e fora de unidades de conservação. Ao início deste trabalho foi hipotetizado que um fragmento mais conservado dificultaria a ocorrência de estrutura genética das populações que abrigasse, já que os processos de fluxo gênico neutralizariam a compartimentação dos genes no espaço, ocorrido por deriva genética.

2. Material e Métodos

2.2. Fragmentos florestais e populações amostradas

A pesquisa foi realizada em três remanescentes florestais no município de Una – Bahia. Estão inseridas em um dos grandes remanescentes de florestas existente no bioma Mata Atlântica, possuindo composição de espécies vegetais semelhantes, com estágios de desenvolvimento distintos (Ribeiro et al., 2009). A Reserva Biológica de Una (População 1) pertence a uma unidade de conservação de proteção integral, que possui como objetivo permitir a conservação de toda fauna, flora e recursos naturais em sua totalidade, não permitindo as modificações antrópicas. A Reserva Particular do Patrimônio Natural Nova Angélica (População 2) está inserida em uma unidade de conservação de uso sustentável, a qual tem por

objetivo combinar o uso dos recursos naturais com a preservação do ambiente. A Fazenda Juerana (População 3) em um fragmento que é mantido pela propriedade privada, mas que não é caracterizada como uma unidade de conservação, sendo utilizado para os diversos fins, onde a conservação ambiental não é objetivo principal. A distância média entre os três fragmentos é de 7.4km (Figura 1), estando situados em uma das últimas regiões de remanescentes de floresta de domínio da Mata Atlântica no Sul da Bahia.

A região vem sendo estudada exaustivamente em termos de conservação (Martini et al., 2007; Faria et al., 2009; Moraes, 2012; Ganzhorn et al., 2015; Santos et al., 2015), pois a Floresta Ombrófila Densa da Bahia possui os maiores fragmentos de Floresta Atlântica do Brasil, sendo classificada como *hotspot* de biodiversidade para ações de conservação prioritárias (Martini et al., 2007; Laurence, 2009).

Essas três áreas são grandes fragmentos de floresta úmida, com características distintas entre si. A REBIO de Una (População 1) foi criada em 1980 e é a área mais conservada quando comparada as outras duas. A População 2 (RPPN Nova Angélica) é formada por florestas secundárias, onde é possível diagnosticar o corte seletivo e a presença do cultivo de piaçava (*Attalea funifera*), cacau (*Thebroma cacao*) e seringa (*Hevea brasilienses*), e em 2005 foi a primeira RPPN formalmente reconhecida pelo Estado da Bahia. A População 3 (Fazenda Juerana) se assemelha a anterior quanto a presença do corte seletivo e de uso da terra, além da substituição total da floresta por pastagem em locais próximos ao fragmento, sendo a que está inserida em uma paisagem com menor nível de conservação.

Os indivíduos de *M. maxima* foram amostrados nas três áreas. Para cada indivíduo adulto coletado, foi coletado também um indivíduo jovem dentro de um raio de 10 metros. Esse mesmo indivíduo jovem não poderia estar inserido no raio do próximo adulto. Foram consideradas como árvores jovens, aquelas que possuíam um valor de CAP (circunferência da altura do peito) igual ou menor que 20 cm e adultas as que possuísem um CAP igual ou superior a 70 cm.

De modo aleatório foram coletadas folhas de 144 indivíduos, sendo 24 jovens e 24 adultos em cada região de coleta. Cada um destes, foi mapeado com ajuda de GPS (Sistema de Posicionamento Global) para identificação da localização espacial. Com os dados do GPS foi possível o desenvolvimento dos mapas pelo software DIVA-GIS 2.0 (Hijmans et al., 2002).

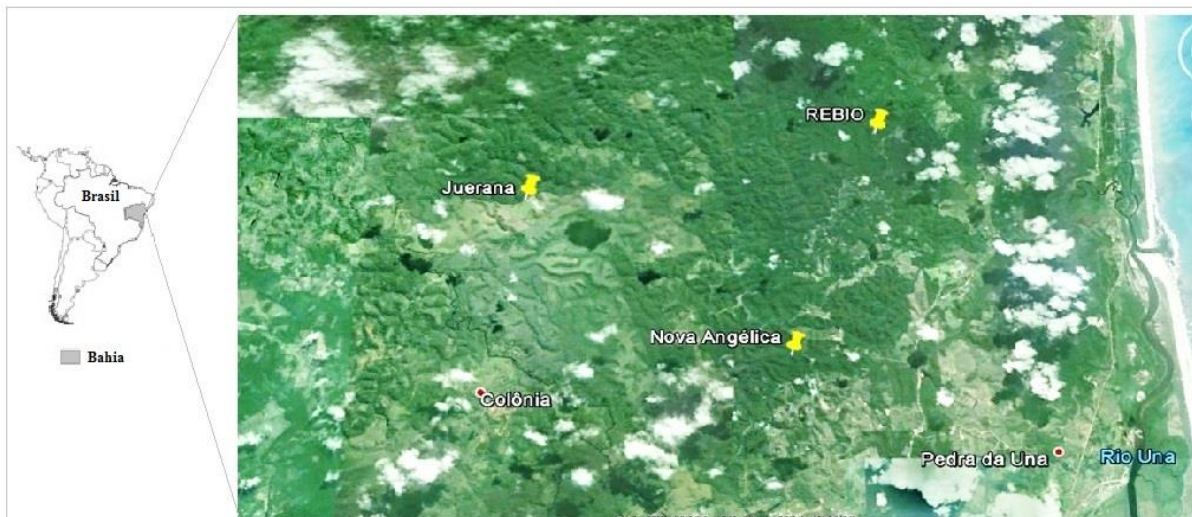


Figura 1. Mapa da área de estudo no sul da Bahia, nordeste do Brasil, mostrando os remanescentes de Mata Atlântica, onde foram realizadas as coletas de *Manilkara maxima*.

2.3.Extração de DNA genômico e amplificação por PCR

O DNA das amostras foliares foi extraído pelo protocolo CTAB (Doyle & Doyle, 1990). Posteriormente, este material foi quantificado por meio da comparação com DNA de concentração conhecida de bacteriófago lambda (DNA λ) em gel de agarose 0,8%, corado com GelGreenTM e analisado em transluminador de luz de LED. Em seguida, as amostras de DNA foram diluídas a 2,5ng/ μ l em água ultrapura, sendo armazenadas a -20°C.

Para análise da diversidade genética foram utilizados 17 marcadores microssatélites específicos desenvolvidos para a espécie alvo (Silva-Junior et al., 2016). A amplificação por PCR foi efetuada em termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems) onde foi utilizado um *mix* com volume final de 13 μ l, contendo 1,3 μ l de tampão 10x, 3,25mM de dNTPs, 9,75mM MgCl₂, 3,25mg BSA (albumina do soro bovino) (Sigma), 1U Taq DNA polymerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), 3,9 μ M da mistura do *primer forward* e *reverse* com cauda M13 marcado com 6-FAMTM, VIC[®], PET[®] ou NEDTM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 7,5ng de DNA genômico. O termociclador seguiu um programa de amplificação nas seguintes condições: 94°C durante 1 min, seguido por 30 ciclos de 94°C durante 45 segundos, temperatura de anelamento específica para cada par de iniciadores (Silva-Junior et al., 2016) durante 45 segundos, 72°C durante 45 segundos, seguido por 10 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 53°C durante 45 segundos, 72°C durante 45 segundos, e uma extensão final de 72° durante 5 minutos. O produto final da PCR foi verificado no analisador genético

ABI 3500 (Applied Biosystem) com marcador GS500LIZ (Applied Biosystem). O tamanho dos fragmentos foi definido no software GeneMapper® (Applied Biosystem).

2.4. Análises genéticas

Utilizando o software CERVUS 3.0.3. (Kalinowski et al., 2007) foram estimados para cada população o número de alelos por loco (A), heterozigosidade esperada (H_E) e a heterozigosidade observada (H_O) (Kalinowski et al., 2007). As significâncias da média desses índices foram estimadas sob o intervalo de confiança de 95% para todos os locos. Esses dados comparam a heterozigosidade esperada para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg com a heterozigosidade observada. Um resultado com índice de H_E superior a H_O demonstra uma perda de diversidade genética. Os índices genéticos (H_E , H_O , A e F_{IS}) entre as diferentes populações foram comparados por meio do teste *t-student* para amostras independentes, utilizando a linguagem de programação R (Pelissier & Goreaud, 2013).

Utilizando-se do CERVUS 3.0.3. (Kalinowski et al., 2007) também foi possível estimar o fluxo gênico contemporâneo através da análise de paternidade, onde todos os 72 indivíduos adultos foram considerados como potenciais genitores dos 72 jovens. A metodologia utilizada foi o de alocação categórica, uma vez que não havia conhecimento sobre os supostos pais (Sancristobal & Chevalet, 1997). O genitor mais provável foi definido a partir da correspondência entre os locos analisados, sendo considerado também os valores da estatística Delta e “LOD – score”. Por meio destes dados foi possível inferir sobre o potencial da dispersão da espécie em estudo no ambiente analisado.

Para as estimativas de coeficiente de endogamia (F_{IS}) de cada população, foi utilizado o software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995). Este índice foi usado para inferir acerca da perda de heterozigotos por causa do aumento do número de cruzamento entre indivíduos aparentados (Goudet, 1995). Outro índice das estatísticas F de Wright (Wright, 1965) o coeficiente de coancestria (F_{ST}), foi estimado a fim de possibilitar a caracterização da estrutura genética entre as populações. Essas estimativas permitem inferir sobre uma possível divergência genética entre as populações, sendo um dado importante no estudo da estrutura genética (Peakall & Smouse, 2006) influenciando no fluxo gênico e nas estratégias de conservação das populações a serem adotadas.

Para a análise de estrutura populacional, visando identificar as populações de acordo com o *pool* gênico e alocar os indivíduos nas populações, foi usado o software Structure

(Pritchard et al., 2000) que utiliza uma abordagem de agrupamento Bayesiano atribuindo probabilisticamente os indivíduos aos seus grupos genéticos baseados nos genótipos. O ensaio foi feito utilizando de uma a seis grupos ($K=1, K=2, K=3, \dots, K=6$), utilizando dez corridas para cada K , com 10.000 repetições e um período de execução também de 10.000. O valor do melhor K foi obtido através da metodologia de Evanno et al. (2005) por meio do programa Structure Harvester (Pritchard et al., 2000).

3. Resultados

Como resultado da genética descritiva, observou-se que os adultos das três populações mostraram valores semelhantes para o número de alelos, diversidade gênica, heterozigosidade observada. Esses índices também se apresentaram semelhantes para os indivíduos jovens. Quando tratados como uma única população sem a distinção entre categorias de indivíduos (jovens e adultos), os dados referentes a heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade observada (H_O) e coeficiente de endogamia (F_{IS}) permaneceram semelhantes, porém os valores do número de alelos aumentaram (Tabela 1). Contudo essa diferença numérica não foi estatisticamente significativa (p -valor $> 0,05$). Os valores médios H_O foram menores que os da H_E , indicando déficit de indivíduos heterozigotos em alguns dos locos analisados, tanto para os jovens quanto para os adultos.

Tabela 1. Médias dos índices genéticos calculados para árvores jovens e adultas de *M. maxima*. Número de alelos (A), diversidade gênica (H_E), heterozigosidade observada (H_O), coeficiente de endogamia (F_{IS}).

	Local	A	H_O	H_E	F_{IS}
Adultos	População 1	8.64	0.64	0.76	0.07
	População 2	7.47	0.60	0.73	0.11
	População 3	8.76	0.71	0.76	0.06
Jovens	População 1	8.82	0.67	0.76	0.09
	População 2	8.94	0.63	0.74	0.08
	População 3	9.29	0.69	0.74	0.07
Jovens + Adultos	População 1	11.71	0.66	0.78	0.08
	População 2	10.29	0.62	0.74	0.09
	População 3	11.82	0.70	0.76	0.04

Tabela 2. Valores de F_{ST} calculados entre as três populações.

População 1	População 2	População 3	
0.000			População 1
0.022	0.000		População 2
0.036	0.054	0.000	População 3

Por meio da análise de paternidade, foram encontrados 12 prováveis genitores dentro e entre as populações (Figura 2). A população 3 (fora de unidade de conservação) foi aquela que apresentou maior isolamento, com restrição de fluxo gênico encontrado apenas entre indivíduos presentes no interior do fragmento (Tabela 3) (Figura 2). Já as populações 1 e 2, que se encontram dentro de áreas de preservação mostraram maior número de eventos de fluxo gênico tanto dentro quanto entre populações (Tabela 3) (Figura 2). Considerando-se apenas a população 1 (dentro de Unidade de Conservação), sete indivíduos jovens tiveram seu possível genitor encontrado, destes o adulto (A65) foi aquele que possuiu maior sucesso reprodutivo.

Quando todos os indivíduos adultos das três populações foram considerados na análise, observou-se que três adultos da População 1 identificados como (A44, A38 e A42) foram atribuídos como prováveis genitores de dois diferentes jovens (J76 e J83) pertencentes a

População 2 (Tabela 3). Além disso, vale salientar que um provável par de genitores (A38 e A42) foi encontrado para o jovem (J83). Com base nisso, a distância de polinização entre os adultos A38 e A42 foi de 350 metros. A média de dispersão entre os pares (População 2/População 1) foi de 7,6 quilômetros. E a média dentro da População 1 foi de 173,15m, 141,53m na População 2 e 306,12m na População 3 (Figura 2) (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de paternidade de *Manilkara maxima*. Com nível de confiança de 95%.

Jovem	Genitor Atribuído	Total de Locus tipados	Locus válidos	LOD Score	Localidade	Distância em metros
J150	A180	12	10	3.14E+00	Pop 3/Pop 3	576.30
J152	A175	8	8	1.36E+00	Pop 3/Pop 3	35.95
J18	A36	8	7	1.60E+00	Pop 2/Pop 2	161.08
J02	A45	14	14	1.13E+00	Pop 2/Pop 2	201.62
J7	A40	11	11	8.70E+01	Pop 2/Pop 2	87.37
J13	A29	12	11	5.48E-01	Pop 2/Pop 2	116.06
J75	A65	11	11	8.36E+00	Pop 1/Pop 1	464.89
J78	A63	10	9	2.11E+00	Pop 1/Pop 1	340.34
J88	A65	11	11	1.57E+00	Pop 1/Pop 1	18.05
J89	A65	11	10	5.31E+00	Pop 1/Pop 1	10.07
J85	A65	10	9	3.33E-02	Pop 1/Pop 1	156.92
J87	A68	17	15	1.25E+00	Pop 1/Pop 1	48.65
J76	A44	11	11	4.32E+00	Pop 2/Pop 1	7679.74
J83	A38	16	15	3.85E+00	Pop 2/Pop 1	7566.07
J83	A42	16	15	5.21E+00	Pop 2/Pop 1	7567.96

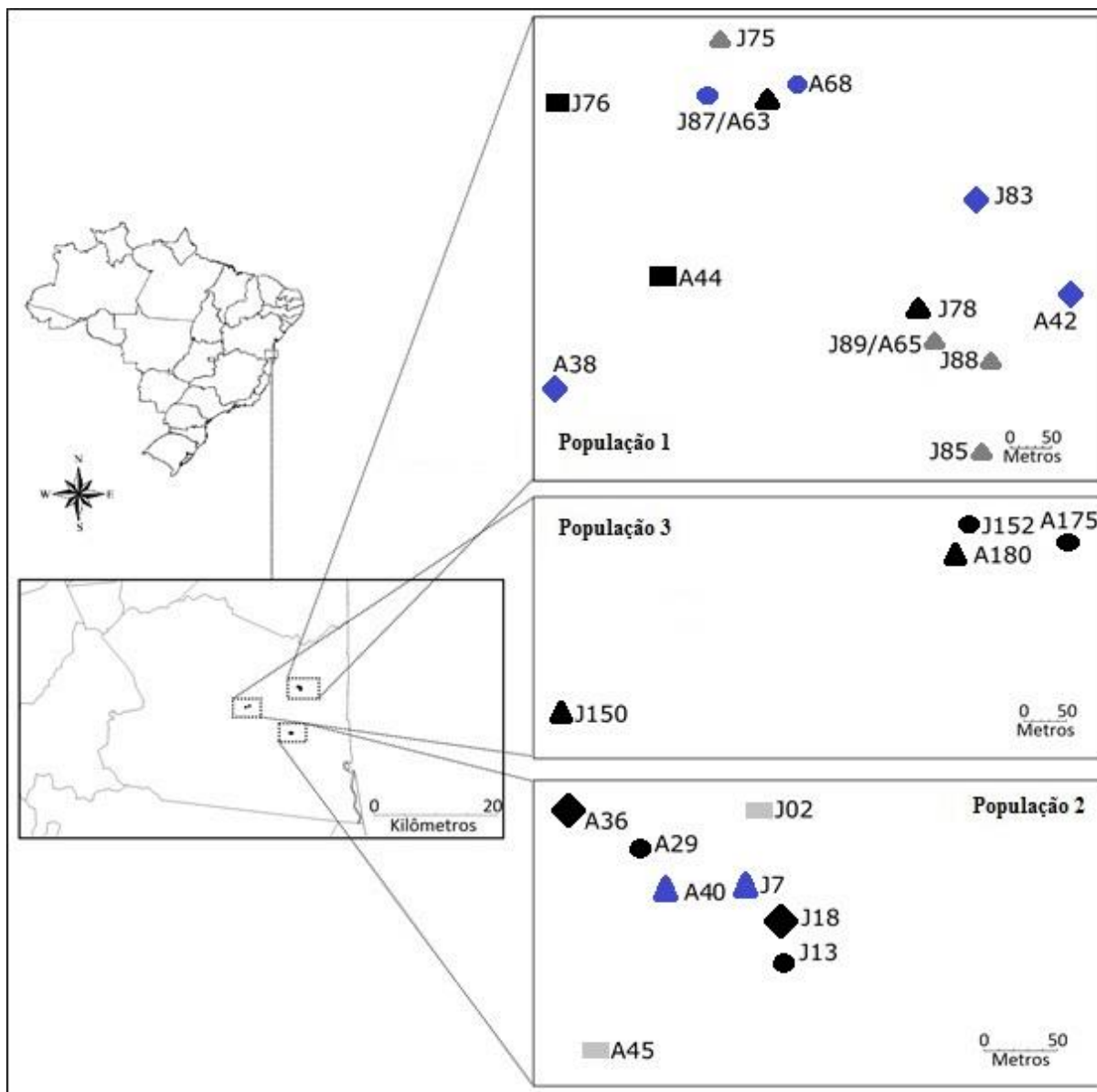


Figura 2. Representação da distribuição geográfica das amostras que possuíam parentesco. Indivíduos com mesmas cores e padrões geométricos formam par (Jovem x Adulto) mostrado pelas letras “A” (adultos) e a letra “J” (jovens).

Considerando-se todos os indivíduos (jovens + adultos – Figura 3A) ou apenas os jovens (Figura 3B), nossos resultados mostraram haver estrutura genética agrupando-os em dois *pool* gênicos. Entretanto, quando apenas os adultos foram considerados na análise houve uma estrutura genética em três *pool* gênicos, demonstrando um padrão diferente dos anteriores.

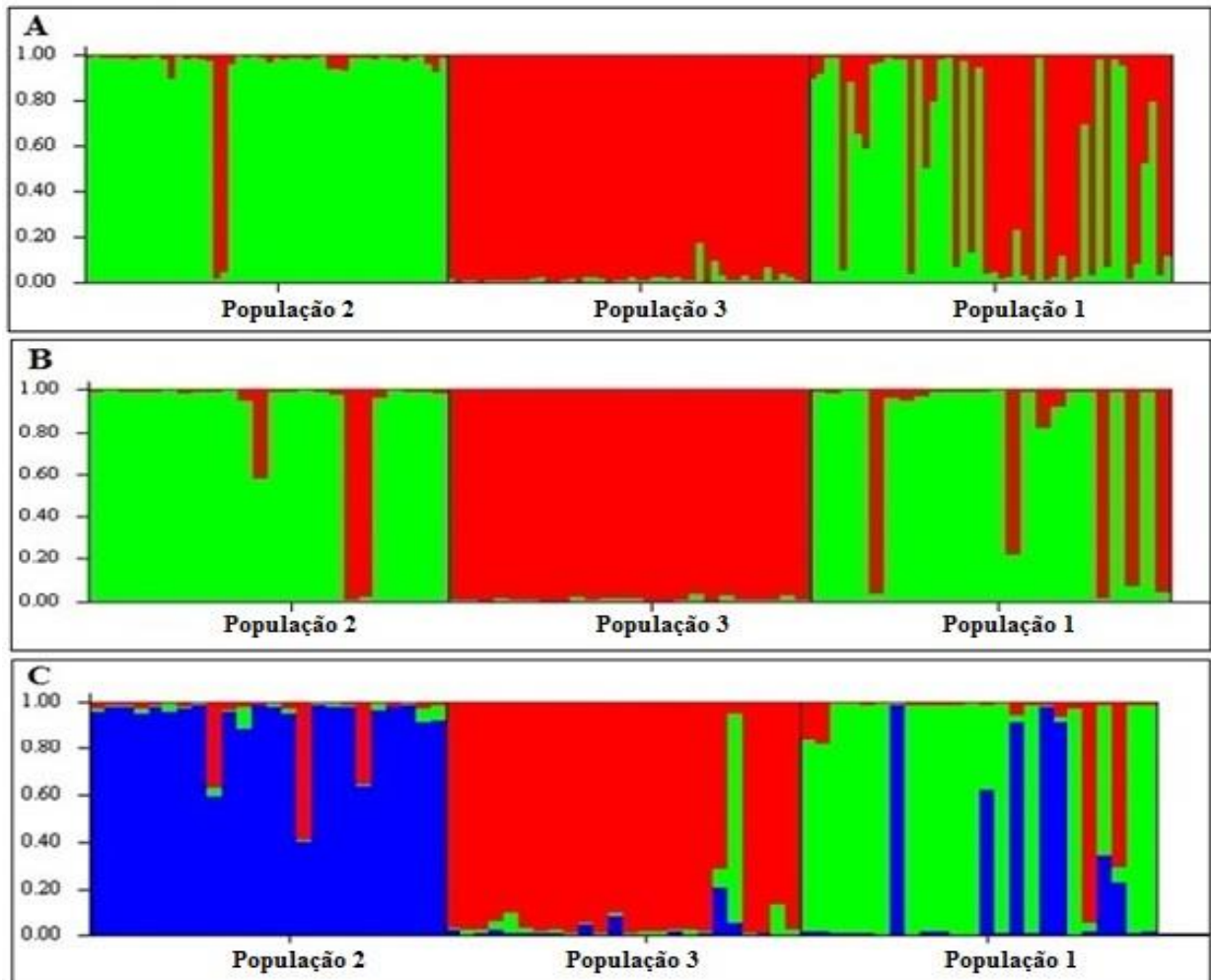


Figura 3. A. Representação de barra gerado pelo Structure para indivíduos jovens e adultos. B. Somente jovens. C. Somente adultos. *M. maxima* amostrados em três fragmentos florestais do sul da Bahia. Cada indivíduo amostrado é representado por uma única linha vertical. As cores distintas (azul, verde e vermelho) representam diferentes *pool* gênicos presentes em cada indivíduo.

4. Discussão

As investigações genéticas efetuadas nesta pesquisa, a partir de locos microssatélites específicos, evidenciaram a existência de fluxo gênico dentro das três populações de *M. maxima* estudadas, havendo trocas genéticas apenas entre os dois fragmentos com maior cobertura florestal na paisagem e que estão inseridas em unidades de conservação (População 1 e 2). Ainda, a população inserida dentro de uma UC de proteção integral (População 1), foi a que possuiu maior número de fluxo dentro e entre as populações. Estas observações sugerem que a manutenção de unidades de conservação possibilita a preservação da *M. maxima*, bem como das espécies que possuem relação ecológica com a mesma.

Não houve diferença significativa na comparação dos resultados referentes ao número de alelos (A), diversidade gênica (H_E), heterozigosidade observada (H_O) e coeficiente de endogamia (F_{IS}). Não houve uma diminuição da variabilidade genética entre os indivíduos jovens e adultos nos diferentes fragmentos florestais. O excesso de indivíduos homozigotos nos adultos em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, pode ser explicado pela não existência de mecanismos de seleção contra indivíduos homozigotos (Barret, 2003). A presença de endogamia nas populações ($F_{IS} \neq 0$) pode ser explicada pelo cruzamento de indivíduos aparentados devido à dispersão na espécie ser em pequena escala (França, 2013). Contudo, estas estimativas de genética descritiva devem ser interpretadas com cautela, pois a *M. maxima* é uma arbórea de grande porte e que possui ciclo de vida longo (Pennington, 1990), sendo necessárias muitas gerações para se detectar diferenças significativas nestas estimativas (Santos et al., 2015).

A maior estrutura genética encontrada entre as Populações 2 e 3 (jovens+adultos – Tabela 2) deve-se provavelmente a não existência de conectividade paisagística entre estas populações. Essa falta de conexão paisagística entre os fragmentos pode ter impedido ou diminuído o fluxo gênico que, possivelmente, é realizado pelo mico-leão-da-cara-dourada e pelo sagui-de-juba-preta (Raboy et al., 2008; Oliveira, 2009) ambos primatas que comumente são afetados pela fragmentação (Peres, 1993; Grativol et al., 2001). Vale salientar que há conexão a nível de paisagem entre a população 1 e 2.

Já o baixo nível de diferenciação entre a População 1 e 2, População 1 e 3 (jovens + adultos – Tabela 2), pode ser explicado pelo fato da População 1 estar dentro de uma unidade de conservação de proteção integral e possuir ampla cobertura florestal, proporcionando a manutenção da variabilidade entre as mesmas. O remanescente inserido na UC serve como fonte de propágulos e variabilidade genética para as outras populações que estão próximas a ele.

O fluxo gênico é um dos recursos mais importantes na compreensão das consequências causadas pela ação antrópica no meio ambiente. O êxito das investigações de paternidade foi obtido através da seleção de marcadores SSR, aliados com a quantidade de indivíduos amostrados. Baseado nos testes de paternidade somado às distâncias documentadas entre os genitores e jovem, consideramos que a dispersão de semente de *M. maxima* ocorre em curtas distâncias, sendo a média de dispersão máxima 7,6 km, como também foi encontrado por outro autor utilizando a mesma espécie (França, 2013). A existência de fluxo gênico demonstra a

presença ativa de polinizadores e dispersores nas áreas pesquisadas, corroborando com dados de outros autores, onde foi observada que essas arbóreas eram constantemente visitadas por aves, primatas, moscas e abelhas (Azevedo et al., 2007; Pessoa, 2008). Os valores de distância de dispersão encontrados neste trabalho corroboram com os resultados de outras pesquisas com espécies do mesmo gênero, onde se considerou que o gênero *Manilkara* era dispersado em pequena escala (Azevedo et al., 2007).

Vale salientar que na região da População 1 encontrou-se um maior índice de prováveis genitores nas populações estudadas (Tabela 3), sendo de suma importância considerar as características dessa área nesse resultado, pois é aquela que devido ao tempo de criação da reserva (há mais de 36 anos), possui o maior nível de cobertura florestal e maior área entre as três pesquisadas. Estes aspectos provavelmente favoreceram positivamente a espécie, uma vez que as ações humanas foram isoladas e as consequências do processo de degradação foram diminuídos consideravelmente. A existência da unidade de conservação em boas condições ambientais proporcionou a manutenção de um grande número de árvores nesta população que está conectada às demais estudadas via fluxo gênico auxiliado por uma matriz variegada composta por diferentes usos da terra incluindo sistemas agroflorestais.

O tamanho do fragmento consegue influenciar diretamente na manutenção e sobrevivência das diversas populações de plantas ali inseridas (Laurance et al., 1998). Os fragmentos maiores são importantes para a conservação pois possuem um número maior de indivíduos reprodutivamente maduros, os quais são necessários para a restauração dos novos indivíduos (Ganzhorn et al., 2015). Quanto menor for a área geográfica, maior será a ação dos fatores externos sobre ele. Muitas pesquisas destacam que há uma intensificação dos efeitos de borda em pequenos fragmentos, ocasionando o aumento na mortalidade de árvores, modificações nas temperaturas dos microclimas e na ação dos ventos (Murcia, 1995). Além disso, esses remanescentes com tamanho reduzido, por terem uma menor área, abrigam pequenas populações e em muitos casos são inviáveis para a manutenção da espécie (Hanski & Simberloff, 1997). Perdas consideráveis de variabilidade genética podem ocorrer em populações pequenas isoladas. Contudo, a migração de indivíduos entre populações tende a equilibrar os efeitos da fragmentação. Mesmo uma baixa frequência de movimento entre populações, como mostramos, já é suficiente para minimizar a perda de variabilidade genética associada à pequena densidade demográfica (Allendorf & Leary, 1986; Young et al., 2001; Fahrig, 2003; Paciência & Prado, 2004;).

Dessa maneira, a existência de unidades de conservação conectadas por corredores é almejada pelos conservacionistas uma vez que, possibilitam a formação de uma rede habitats, permitindo a conectividade genética entre as populações e um aumento da diversidade (Ayres et al., 2005; Stofer et al., 2007; Soane et al., 2010). No caso do sul da Bahia, a paisagem variegada e a presença de muitas propriedades com sistema de cultivo de agroflorestas, tem função semelhante a um corredor ecológico (Sambuichi, 2006). Em fragmentos pequenos e isolados as populações têm menor perspectiva de sobrevivência em relação às populações em fragmentos conectados. A conectividade entre os remanescentes proporcionada pelos corredores é de enorme valor para o dinamismo nas populações, já que permite o fluxo gênico entre as subpopulações, permitindo a manutenção da diversidade genética (Soane et al., 2010; Herrera, 2011).

A estrutura genética por meio da abordagem Bayesiana agrupou os indivíduos (jovens + adultos – Figura 3A) ou apenas jovens (Figura 3B) em dois *pool* gênicos (verde e vermelho). O grupo verde está concentrado na População 2 e o vermelho na População 3. Nota-se uma grande diferenciação entre a maior parte da População 2 com relação a População 3, formando um grupo isolado com *pool* gênico de até 90% diferenciado dos demais indivíduos. Valores acima de 80% já permitem incluir um indivíduo majoritariamente a um grupo (Pritchard et al., 2000). Esse comportamento genético pode ter sido motivado como resposta ao isolamento paisagístico.

Quando analisados somente os indivíduos adultos (Figura 3C), foram detectados três *pool* gênicos, indicando maior estrutura genética, indo de encontro ao esperado. Esse resultado pode ser justificado da seguinte maneira. A espécie não realiza seleção contra pólen de vizinhos próximos (França, 2013), e possui dispersão em pequena escala como os resultados desta pesquisa demonstram. Aliado a isso, existe a formação de banco de plântulas durante a germinação, sugerindo a formação de “microilhas de *pool* gênico”, levando a um processo natural de estrutura (Figura 3C – População 1).

Esse aspecto pode ter sido acentuado pelo processo de fragmentação e ao histórico de perturbações na Mata Atlântica que ocorre desde o período colonial (Galindo-Leal & Câmara, 2003). Os indivíduos adultos podem ter sido subdivididos e outrora aqueles conjuntos gênicos que eram transferidos passaram a ter uma diminuição visto que é notável nesses remanescentes a existência do corte seletivo da espécie, o que não permite a conservação de todos os adultos (Figura 3C – População 2 e 3).

Os resultados obtidos demonstram que, a conservação de populações de *M. maxima* em unidades de conservação facilita o fluxo gênico entre os indivíduos inseridos no fragmento bem como favorece a manutenção das populações presentes em remanescentes do entorno. Vale ressaltar a importância das unidades de conservação, não somente na preservação do conteúdo genético, mas também, como áreas estudo e análise para o aperfeiçoamento das estratégias de proteção dos recursos ambientais.

5. Referências Bibliográficas

ALLENDORF, F.W.; LEARY, R.F. 1986. **Heterozygosity and fitness in natural populations of animals.** In M. E. Soulé (ed.), Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity. Sinauer Associates, Sunderland, MA. v.4. pp. 57-76

AYRES, J.M.; FONSECA, G.A.B. DA; RYLANDS, A.B.; QUEIROZ, H.L.; PINTO, L.P.; MASTERSON, D.; CAVALCANTI, R.B. 2005. Os corredores ecológicos das florestas tropicais do Brasil. Belém, PA (Brasil). Sociedade Civil Mamirauá, Belém, PA (Brasil). 255 p.

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

BACLES, C.F.E. & JUMP, A.S. 2011. **Taking a Tree's Perspective on Forest Fragmentation Genetics.** Trends in Plant Science. v.16. pp.13–18.

BARRET, S.C.H. 2003. **Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond.** Philosophical Transactions of the Royal Society of London London, v.358. pp.991–1004.

COULON, A.; COSSON, J.F.; ANGIBAULT, J.M.; CARGNELUTTI, B.; GALAN, M.; MORELLET, N.; PETIT, E.; AULAGNIER, S. & HEWISON, J.M. 2004. **Landscape**

connectivity influences gene flow in landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology*. v.13. pp.2841-4850.

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

EARL, D.A. & VONHOLDT, B.M. 2012. **Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method.** *Conservation Genetics Resources*. v.4. pp.359-361.

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

FAHRIG, L. 2003. **Effects of habitat fragmentation on biodiversity.** *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. v. 34. pp. 487-515.

FARIA, D.; MARIANO-NETO, E.; MARTINI, A.M.Z.; ORTIZ, J.V.; MONTINGELLI, R.; ROSSO, S.; PACIENCIA, M.L.B.; BAUMGARTEN, J. 2009. **Forest structure in a mosaico of rainforest sites: The effect of fragmentation and recovery after clear cut.** *Forest Ecology and Management*. v.257. pp. 2226-2234.

FRANÇA, D.S. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Manilkara maxima* em fragmento florestal no sul da Bahia, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus. 74p.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA I.G. 2003. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: Galindo-Leal C.; Câmara I.G. **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook.** Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, Washington, D.C. v.17. pp. 03-11.

GANZHORN, S.; PEREZ-SWEENEY, B.; THOMAS, W.; GAIOTTO, F.; LEWIS, J. 2015. **Effects of fragmentation on density and population genetics of a threatened tree species in a biodiversity hotspot.** *Endangered Species Research*. v.26. pp.189-199.

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

GRATIVOL, A.D., BALLOU, J.D., FLEISCHER, R.C. 2001. **Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*)**. Conservation Genetics. v2. pp.1-9.

HANSKI, I. & SIMBERLOFF, D. 1997. **The metapopulation approach, its history, conceptual domain and application to conservation**. In: I. Hanski & E. Gilpin, Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution, Academic Press, London. pp. 4-26.

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

HERRERA, J. M. 2011. **El papel de la matriz en el mantenimiento de la biodiversidad en hábitats fragmentados. De la teoría ecológica al desarrollo de estrategias de conservación**. Ecosistemas. v. 2. pp. 21-35.

HIJMANS, R.J.; GUARINO, L.; ROJAS, E. 2002. **DIVA-GIS, version 2. A geographic information system for the analysis of biodiversity data**. International Potato Center, Lima, Peru. [Manual, version 2].

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. 1998. **Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas**. Série técnica, IPEF. v.12. pp.65-70.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHAL, T.C. 2007. **Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment**. Molecular Ecology. v.16. pp.1099-1106.

LAURANCE, W. F.; FERREIRA, L. V.; RANKIN-DE-MERONA, J. M.; LAURANCE, S. G., HUTCHINGS, R. W.; LOVEJOY, T. E. 1998. **Effects of forest fragmentation on**

recruitment patterns in amazonian tree communities. Conservation Biology. v.12. pp. 460-464.

LAURANCE, W.F. 2009. **Conserving the hottest of the hotspots.** Biology Conservation. v.142. pp.1137.

LEIMU, R.; MUTIKAINEN, P.; KORICHEVAS, J.; FISCHER, M. 2006. **How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation?** Journal of Ecology. v.94. pp.942-953.

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

MITTERMEIER, R.A.; MYERS, N.; THOMSEN, J.B.; DA FONSECA, G.A.B.; OLIVIERI, S. 1998. **Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities.** Conservation Biology. v.12. pp.516-520.

MONTAGNA, T.; KLOCK, D.F.; STEINER, F.; DAROS, C.F.; BITTENCOURT, R.; ZAGO, J.S.; MANTOVANI, A.; SEDREZ, M.R. 2012a. **A Importância das unidades de conservação na manutenção da diversidade enética de Xaxim (*Dicksonia sellowiana*) no Estado de Santa Catarina.** Biodiversidade Brasileira.v2. pp. 26–32.

MONTAGNA, T.; KLOCK, D.F.; STEINER, F.; DAROS, C.F.; BITTENCOURT, R.; ZAGO, J.S.; MANTOVANI, A.; SEDREZ, M.R. 2012b. **A Importância das unidades de conservação na manutenção da diversidade genética de araucária (*Araucaria angustifolia*) no Estado de Santa Catarina.** Biodiversidade Brasileira.v2. pp. 17–24.

MORAES, M.L.T.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. 2005. **Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas.** Revista Árvore. v.29. pp.281-289.

MORAES, R.C.S. 2012. **Diversidade e estrutura genética em populações de *Manilkara multifida* Penn. no Sul da Bahia.** Dissertação de (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus. 43p.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. 2000. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** Nature. v.403. pp.853–858.

MURCIA, C. 1995. **Edge effects in fragmented forests: implications for conservation.** Trends in Ecology & Evolution. v.10. pp. 58-62.

OLIVEIRA, L.C.; HANKERSON, S.J.; DIETZ, J.M.; RABOY, B.E. 2009. **Key tree species for the golden-headed lion tamarin and implications for shade-cocoa management in southern Bahia, Brazil.** Animal Conservation. The Zoological Society of London. v.13. pp.60-70.

OUBORG, N. J. 1993. **Isolation, population size and extinction: the classical and metapopulation approaches applied to vascular plants along the Dutch Rhine-system.** Oikos. v.66. pp.298-308.

PACIÊNCIA, M.L.B.; PRADO J. 2004. **Efeitos de borda sobre comunidades de pteridófitas na Mata Atlântica da região de Una, sul da Bahia, Brasil.** Revista Brasil. Bot. v.27. pp.641-653.

PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. 2006. **Genalex 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research.** Molecular Ecology Notes. v.6. pp.288-295.

PELLISSIER, R.; GOREAUD, F. 2013. ads: **Spatial point patterns analysis. R package version 1.3-3.** Disponível em: <[http:// CRAN.R-project.org/package=ads](http://CRAN.R-project.org/package=ads)>. Acesso em: 25 de novembro 2015.

PENNINGTON, T. D. 1990. **Sapotaceae.** In: Flora Neotropica, The New York Botanical Gardens, New York, v.52. 770p

PENNINGTON, T.D. 2006. **Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Sapotaceae.** Rodriguésia. v.57. pp.251–366.

PERES, C.A. 1993. **Structure and spatial organization of an Amazonian terra firme forest primate community.** Journal of Tropical Ecology. v. 9. pp.259-276.

PESSOA, M. S. 2008. **Comparação da comunidade arbórea e fenologia reprodutiva de duas fisionomias em floresta atlântica no sul da Bahia, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus. 81p.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. 2000. **Inference of population structure using multilocus genotype data.** Genetics. v. 155. pp.945–959.

RABOY, B.E.; CANALE, G. R.; DIETZ, J.M. 2008. **Ecology of *Callithrix kuhlii* and a review of eastern Brazilian marmosets.** International Journal of Primatology. v.29. pp.449-467.

RAJORA, O.M. & MOSSELER, A. 2001 **Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources.** Euphytica. v.118. pp.197-212.

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

RYLANDS, A.B.; BRANDON, K. 2005. **Unidades de conservação brasileiras.** Megadiversidade. v.7. pp.27-35.

SAMBUICHI, R. H. R. 2006. **Estrutura e dinâmica do componente arbóreo em área de cabruca na região cacauzeira do sul da Bahia, Brasil.** Acta Botanica Brasilica. v. 20. pp. 25-32.

SANCRISTOBAL, M. & CHEVALET, C. 1997. **Error tolerant parent identification from a finite set of individual.** Genetical Research. v.70. pp.53-62.

SANTOS, A. S.; CAZETTA, E.; MORANTE-FILHO, J.C.; BAUMGARTEN, J.; FARIA, D.; GAIOTTO, F. A. 2015. **Lessons from a palm: genetic diversity and structure in anthropogenic landscapes from Atlantic Forest, Brazil.** Conservation Genetics. v.16. pp.295–1302.

SILVA-JUNIOR, J.A.; FRANÇA, D. S.; MORAES, R.C.S.; GAIOTTO, F.A. 2016. **Development of microsatellite markers for *Manilkara maxima* T.D. Penn. (Sapotaceae) and its use in conservation genetics.** Molecular Biology Reports. v.43 pp.1-5.

SOANE, C.E.S.; DIAZ, V.S.; SANTOS, T.L.; FROUFE, L.C.M. 2010. **Corredores ecológicos como ferramenta para desfragmentação de florestas tropicais.** Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo. v.30. pp. 207-216.

STORFER, A.; MURPHY, M.A.; EVANS, J.S.; GOLDBERG, C.S.; ROBINSON, S.; SPEAR, S.F.; DEZZANI, R.; DELMELLE, E.; VIERLING, L.; WAITS, L.P. 2007. **Putting the landscape in landscape genetics.** Heredity. v.98. pp.182-142.

TABARELLI, M. & GASCON, C. 2005. **Lições da pesquisa sobre fragmentação: aperfeiçoando políticas e diretrizes de manejo para a conservação da biodiversidade.** In: Megadiversidade: Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade no Brasil. Conservação Internacional-Brasil. v.1. pp.181-188.

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

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. 1996. **The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants.** Trends in Ecology and Evolution. v.11. pp.413-418.

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

CONCLUSÕES GERAIS

Os *primers* SSR nucleares desenvolvidos para *Manilkara maxima* se mostraram altamente discriminatórios para análises populacionais. A partir da utilização dos mesmos, foi possível diagnosticar altos níveis de diversidade e a estrutura genética entre as populações estudadas. A população inserida em unidade de conservação foi aquela que possuiu melhores indicadores genéticos, contribuindo inclusive com propágulos para a manutenção da conectividade desta com as demais populações amostradas. Assim, a manutenção e o incremento de unidades de conservação no território nacional é salutar para a conservação genética de espécies longevas, como as arbóreas, bem como para as outras espécies que possuem algum tipo de relação com a mesma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

AGUIAR, A.P.; CHIARELLO, A.G.; MENDES, S.L.; MATOS, E.N. 2005. **Os Corredores Central e da Serra do Mar na Mata Atlântica brasileira**. In: Galindo-Leal, C.; Câmara, I. G. (Eds.). Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. Belo Horizonte: Fundação SOS Mata Atlântica, Conservação Internacional e Centro de Ciências Aplicadas à Biodiversidade.

ALLENDORF, F.W.; LEARY, R.F. 1986. **Heterozygosity and fitness in natural populations of animals**. In M. E. Soulé (ed.), Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity. Sinauer Associates, Sunderland, MA. v.4. pp. 57-76.

ALVES, S.A.; POMELLA, A.W.; AITKEN, W.M.; BERGAMIN FILHO, A. 2006. **Curvas de progresso e gradientes da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Bahia**. Fitopatologia Brasileira. v.31. pp.483-491.

AYRES, J. M.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A.B.; QUEIROZ, H.L.; PINTO, L. P.; MASTERSON, D.; CAVALCANTI, R. B. 2005. **Os corredores ecológicos das florestas tropicais do Brasil**. Belém: Sociedade Civil. 56p.

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

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. 2006. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG. 374p.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W.B. 2010. **Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros**. In: Biodiversidade 34. Ministério do Meio Ambiente, Brasília-DF. 408p.

EGAN, A.N.; SCHLUETER, J.; SPOONER, D.M., 2012. **Applications of next-generation sequencing in plant biology**. American journal of botany. v.99. pp.175–85.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília: Embrapa-Cenargem. 220p.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D. (2008) **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto, SP:SBG - Sociedade Brasileira de Genética. 280p

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

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA I.G. 2005. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: Galindo-Leal C.; Câmara I.G. (eds.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Fundação SOS Mata Atlântica, Conservação Internacional, Centro de Ciências Aplicadas a Biodiversidade. Belo Horizonte.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA I.G. 2003. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: Galindo-Leal C.; Câmara I.G. **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook**. Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, Washington, D.C. v.17. pp.03-11.

GANZHORN, S.; PEREZ-SWEENEY, B.; THOMAS, W.; GAIOTTO, F.; LEWIS, J. 20015. **Effects of fragmentation on density and population genetics of a threatened tree species in a biodiversity hotspot**. Endangered Species Research. v.26. pp.189–199.

GONZAGA, A.L. 2006. **Madeira: uso e conservação**. IPHAN, Brasília. 244p

GRADA, A. & WEINBRECHT, K. 2013. **Next-Generation Sequencing : Methodology and Application**. Journal of Investigative Dermatology. 133. pp.11–14.

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

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. 1998. **Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas**. Série técnica, IPEF. v.12. pp.65-70.

KAGEYAMA, P.Y.; PERECIM, M.B.; VENCovsky, R. 2003. **Diversidade Genética em Espécies Arbóreas Tropicais de Diferentes Estágios Sucessionais por Marcadores Genéticos**. Scientia Forestalis. v. 64. pp. 93–107.

LAURANCE, W.F. 2009. **Conserving the hottest of the hotspots**. Biology Conservation v.142. pp.1137.

LEIMU, R.; MUTIKAINEN, P.; KORICHEVAS, J.; FISCHER, M. 2006. **How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation?** Journal of Ecology. v.94. pp.942-953.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. 1987. **Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution**. Molecular Biology Evolution. v.4. pp. 2003-221.

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

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

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

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. 2000. **Biodiversity hotspots for conservation priorities**. Nature, London, v.403. pp.853–858.

MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). 2015. >> Biomas>> Mata Atlântica. Disponível em <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>. Acessado em dezembro de 2015.

MMA (Ministério do Meio Ambiente) - SNUC (Sistema Nacional de Unidades de Conservação). 2011. MMA, SNUC, Brasília. Disponível em http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf2008_dap/_publicacao/149_publicacao0507201105295_1.pdf. Acessado em abril de 2016.

MORELLATO, L.P.C.; HADDAD, C.F.B. 2000. **Introduction: The Brazilian Atlantic Forest**. Biotropica.v.32. pp. 786-792.

NEI, M. (1973). **Analysis of gene diversity in subdivided populations**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 70. pp. 3321-3323.

OLIVEIRA, E. J., PÁDUA, J. G., ZUCCHI, M. I., VENCOVSKY, R., LÚCIA, M., & VIEIRA, C. (2006). **Origin, evolution and genome distribution of microsatellites**. DNA Repair. v.307. pp. 294–307.

OLIVEIRA, L.C.; HANKERSON, S.J.; DIETZ, J.M.;RABOY, B.E. 2009. Key tree species for the golden-headed lion tamarin and implications for shade-cocoa management in southern Bahia, Brazil. Animal Conservation. The Zoological Society of London. v.13. pp.60-70.

PARDINI, R.; FARIA, D.; ACCACIO, G. M.; LAPS, R. R.; MARIANO, E.; PACIENCIA, M. L. B.; DIXO, M.; BAUMGARTEN, J. 2009. **The challenge of maintaining Atlantic forest biodiversity: a multi-taxa conservation assessment of an agro-forestry mosaic in southern Bahia**. Biological Conservation. v.142. pp.1178-1190.

PENNINGTON, T. D. 1990. **Sapotaceae**. In: Flora Neotropica, The New York Botanical Gardens, New York, v.52. 770p.

PENNINGTON, T.D., 2006. **Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Sapotaceae.** Rodriguésia. v.57. pp.251–366.

PINTO, L.P. DE S. AND RYLANDS, A.B. 1997. **Geographic distribution of the golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*: Implications for its management and conservation.** Folia Primatologica. v.68. pp.161-180.

O'BRIEN, J.P. 1998. *Manilkara maxima*. The IUCN Red List of Threatened Species 1998:e.T35614A9944600. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T35614A9944600.en>. Visualizado em 12 de dezembro 2015.

RABOY, B.E.; CANALE, G. R.; DIETZ, J.M. 2008. **Ecology of *Callithrix kuhlii* and a review of eastern Brazilian marmosets.** International Journal of Primatology. v.29. pp.449-467.

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

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

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

SANGER, F., & NICKLEN, S. (1977). **DNA sequencing with chain-terminating.** PNAS. v. 74. pp.5463–5467.

SANTOS, A. S.; CAZETTA, E.; MORANTE-FILHO, J.C.; BAUMGARTEN, J.; FARIA, D.; GAIOTTO, F. A. 2015. **Lessons from a palm: genetic diversity and structure in anthropogenic landscapes from Atlantic Forest, Brazil.** Conservation Genetics. v.16. pp.295–1302.

SHENDURE, J., & JI, H. 2008. **Next-generation DNA sequencing**. Nature Biotechnology. v.26. pp.1135–1145.

SILVA, J.M.C.; DE SOUZA, M.C.; CASTELLETTI C.H.M. 2004. **Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic Forest, South America**. Global Ecology and Biogeography. v.13. pp.85–92.

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

STORFER, A.; MURPHY, M.A.; EVANS, J.S.; GOLDBERG, C.S.; ROBINSON, S.; SPEAR, S.F.; DEZZANI, R.; DELMELLE, E.; VIERLING, L.; WAITS, L.P. 2007. **Putting the landscape in landscape genetics**. Heredity. v.98. pp.182-142.

TABARELLI, M.; GASCON, C. 2005. **Lições da pesquisa sobre fragmentação: aperfeiçoando políticas e diretrizes de manejo para a conservação da biodiversidade**. In: Megadiversidade: Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade no Brasil. Conservação Internacional-Brasil. v.1. pp.181-188.

THOMAS, W.W.; CARVALHO, A.M.V., AMORIM, A.M.A.; GARRISON, J.; ARBELÁES, A.A.L. 1998. **Plants endemic in two in southern Bahia, Brazil. Biodiversity and Conservation**. v.7. pp.311-322.

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

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. 1996. **The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants**. Trends in Ecology and Evolution, Cambridge. v.11. pp.413-418.