

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO  
DA BIODIVERSIDADE**



**Fluxo Gênico e Estrutura Genética Espacial de  
*Manilkara maxima* T.D. Penn. em fragmento florestal no  
Sul da Bahia, Brasil**

**Daniele de Souza França**

**ILHÉUS - BAHIA - BRASIL  
Julho de 2013**

**DANIELE DE SOUZA FRANÇA**

**Fluxo Gênico e Estrutura Genética Espacial de  
*Manilkara maxima* T.D. Penn. em fragmento florestal no  
Sul da Bahia, Brasil**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em  
Ecologia e Conservação da  
Biodiversidade

Área de concentração: Ecologia e  
Conservação da Biodiversidade

**ILHÉUS - BAHIA - BRASIL**  
**Julho de 2013**

F814 França, Daniele de Souza.  
Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Manilkara maxima* T.D. Penn. em fragmento florestal no Sul da Bahia, Brasil/  
Ilhéus: UESC, 2013.  
xiv, 59f. : il.  
Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Inclui referências.

1. Ecologia vegetal – Bahia (Sul). 2. Maçaranduba – Mata atlântica – Conservação. 3. Microssatélites (Genética). 4. Florestas tropicais – Preservação – Bahia (Sul). I. Gaiotto, Fernanda Amato. II. Título.

CDD – 581.7

DANIELE DE SOUZA FRANÇA

**Fluxo Gênico e Estrutura Genética Espacial de  
*Manilkara maxima* T.D. Penn. em fragmento florestal no  
Sul da Bahia, Brasil**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação da Biodiversidade

Área de concentração: Ecologia e Conservação da Biodiversidade

APROVADA: 22 de Julho de 2013

-----  
Dra. Adriana Maria Zanforlin Martini  
(USP)

-----  
Dra. Lucia Helena de Oliveira Wadt  
(EMBRAPA)

-----  
Dr. Milton Kanashiro  
(EMBRAPA Amazônia Oriental)

-----  
Dra. Fernanda Amato Gaiotto  
(UESC - Orientadora)

## DEDICATÓRIA



À minha família  
e a todos que sempre me apoiaram  
e acreditaram na minha capacidade,  
DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo dom da vida, proteção, luz e força em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

Aos meus pais, irmã e avó, pelo amor e compreensão.

À Prof. e Dra. Fernanda Gaiotto pelo acolhimento, confiança, orientação, amizade, incentivo, disponibilidade e apoio na realização desse trabalho.

Ao Dr. Eduardo Mariano pela co-orientação e disponibilidade prestadas.

À Dr. Deborah Faria e todos os pesquisadores do Sisbiota pela atenção e suporte prestados.

Ao Dr. Roberto Tarazi pela ajuda em algumas análises.

Ao Programa de pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade e suas funcionárias pela disponibilidade e ajuda prestadas.

Ao Leonardo Neves (do IESB) pelo acolhimento e permissão no uso da RPPN Nova Angélica.

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

À Flora Bittencourt pela amizade, carinho, paciência, disponibilidade e ajuda nas coletas de campo.

À Daniela Borges pelo carinho, amizade e ajuda nas análises.

À Sheila Viana pela amizade e disponibilidade nas coletas de campo.

Ao Rodrigo Bezerra pelo carinho e ajuda no campo.

À Jeiza Leal pela ajuda com os programas.

Ao Horlei pela disponibilidade no laboratório.

Ao Jiomário Souza (Bila) pela amizade e disponibilidade nas saídas de campo.

Ao Caio Vinícius, José Lima da Paixão, Ramiris, Alesandro, Michael, João, Helen e todos que em algum momento foram para as viagens de campo.

Ao seu Zito pelo acolhimento e simpatia durante as estadias na RPPN Nova Angélica.

Aos motoristas da UESC, em especial Valtoni.

A todas as colegas e companheiras do Laboratório de Marcadores Moleculares.

Aos colegas do curso de Ecologia e Conservação da Biodiversidade, em especial, Mayana, Gabriela, Lucas, Gerônimo e Amanda.

Aos colegas dos laboratórios de Citogenética, Biologia Molecular, Cultura de Tecidos e Genômica pelo carinho e suporte nas atividades de laboratório.

Aos meus familiares, amigos e todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

Obrigada.

## Índice

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO GERAL .....	4
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	5
3.1. A ESPÉCIE .....	5
3.2. MATA ATLÂNTICA .....	9
3.3. MARCADORES MOLECULARES .....	12
3.4. MICROSSATÉLITES .....	12
3.5. FLUXO GÊNICO E ANÁLISE DE PATERNIDADE .....	14
3.6. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
4.1. Área de estudo .....	19
4.2. População amostrada na RPPN Nova Angélica .....	20
4.3. Extração de DNA genômico .....	21
4.4. Transferibilidade de marcadores microssatélites .....	21
4.4.1. Condições de amplificação .....	22
4.4.2. Caracterização dos locos e genotipagem .....	23
4.5. Análise dos dados biológicos .....	23
4.5.1 Análise de parâmetros genéticos descritivos por geração .....	23
4.5.2 Análise da distribuição e estrutura genética espacial .....	24
4.5.3 Análise de fluxo gênico .....	24
4.6 RESULTADOS .....	26
4.6.1 Caracterização dos microssatélites .....	26
4.6.2 Parâmetros genéticos por geração .....	27
4.6.3. Distribuição e estrutura genética espacial .....	28
4.6.4. Paternidade .....	32
4.7 DISCUSSÃO .....	35
4.7.1. Transferibilidade de microssatélites .....	35
4.7.2 Parâmetros genéticos entre as gerações .....	36
4.7.3 Distribuição e estrutura genética espacial .....	38
4.7.4 Fluxo gênico e análise de paternidade .....	40
4.8. CONCLUSÕES .....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## RESUMO

### **Fluxo Gênico e Estrutura Genética Espacial de *Manilkara maxima* T.D. Penn. em fragmento florestal no Sul da Bahia, Brasil**

Autora: Daniele de Souza França  
Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto  
Co-orientador: Eduardo Mariano Neto

A alteração da paisagem é um dos principais problemas que afetam a sobrevivência de espécies vegetais em florestas tropicais. *Manilkara maxima* T.D. Penn. (Sapotaceae) destaca-se neste cenário por ser uma espécie arbórea de distribuição restrita na Mata Atlântica e ameaçada de extinção devido à destruição de habitats e ao corte seletivo em algumas localidades. Para a efetiva contribuição da genética na conservação da biodiversidade é necessário saber o nível real de diversidade genética em populações localizadas em paisagens com elevada porcentagem de cobertura florestal. O presente trabalho teve como objetivo investigar a estrutura genética espacial (EGE) e o fluxo gênico contemporâneo em uma população natural de *M. maxima* localizada no sul da Bahia, em uma paisagem com mais de 70% de área florestada. Sob o ponto de vista ecológico, esta região amostrada é considerada em bom estado de conservação. Com base na transferência de seis locos microssatélites nucleares de *Manilkara multifida*, as estimativas revelaram alta diversidade genética intrapopulacional ( $H_E = 0.763$ ) entre os indivíduos adultos ( $n = 281$ ) e jovens ( $n = 83$ ) amostrados. Em adição, a população apresentou índice de fixação considerado baixo para os adultos ( $F_{IS} = 0.078$ ) e moderado para os jovens ( $F_{IS} = 0.140$ ), sugerindo que ao longo das gerações está havendo seleção contra homozigotos. A população apresentou baixa EGE nas duas gerações amostradas. Além disso, os testes de paternidade identificaram processos de migração de pólen e sementes, incluindo eventos a longas distâncias, sugerindo eficiência dos processos de polinização e dispersão. Estes resultados indicam que a população amostrada está se mantendo, também sob o ponto de vista da genética, com elevada variabilidade, podendo servir de modelo para estudos genéticos populacionais em outros ambientes.

**Palavras-chave:** Maçaranduba; Conservação; Microssatélites; Fluxo gênico; Estrutura genética espacial.

## ABSTRACT

### Gene Flow and Spatial Genetic Structure of *Manilkara maxima* T.D. Penn. in a forest fragment in Southern Bahia, Brazil

Author: Daniele de Souza França

Adviser: Fernanda Amato Gaiotto

Co-adviser: Eduardo Mariano Neto

Changes in landscape is one of the main problems that affect the survival of plant species in tropical forests. *Manilkara maxima* T.D. Penn. (Sapotaceae) stands out in this scenario because it is a tree species with restricted distribution in the Atlantic and endangered due to habitat destruction and selective logging in some localities. For effective contribution of genetics in conserving biodiversity is necessary to know the actual level of genetic diversity in populations on landscapes with large percentage of forested area. The present study aimed to investigate the spatial genetic structure (EGE) and contemporary gene flow in a natural population of *M. maxima* located in southern Bahia, in a landscape with more than 70% of forested area. From the ecological point of view, our field area is considered in good conservation status. Based on six transferred nuclear microsatellite loci from *Manilkara multifida*, our estimates for *M. maxima* showed high genetic diversity within populations ( $H_E = 0.763$ ) for adults ( $n = 281$ ) and for saplings ( $n = 83$ ) sampled. In addition, the population had fixation index considered low for adults ( $F_{IS} = 0.078$ ) and moderate for the saplings ( $F_{IS} = 0.140$ ), suggesting that over the generations there is selection against homozygotes. The population had also low EGE for two generations. Furthermore, paternity testing migration identified pollen and seeds, including events over long distances, suggesting efficiency for pollination and dispersion processes. These results indicate that the sampled population is conserved, also from the point of view of genetics, with high variability, which may serve as model for population genetic studies in other environments.

Keywords: Maçaranduba; Conservation; Microsatellite, gene flow, spatial genetic structure.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Remanescentes florestais da Mata Atlântica no ano de 2011-2012. Fonte: Adaptado da Fundação SOS Mata Atlântica/ INPE .....	5
Figura 2-	Caule acinzentado com lenticelas proeminentes de <i>M. maxima</i> de aproximadamente 26 m de altura. Destaca-se a casca interna avermelhada contendo látex branco abundante (indicado pela seta vermelha). Fonte: Daniele França.....	6
Figura 3-	Partes de <i>M. maxima</i> . (A) Fruto maduro. (B) Flor solitária de cor branca. (C) Parte adaxial da folha. Fonte: Daniele França .....	7
Figura 4-	Mapa da localização geográfica do município de Una-BA e da RPPN Nova Angélica. (A) Em vermelho representa o perímetro do município de Una-BA. (B) Em vermelho destaca-se a RPPN Nova Angélica próxima a duas Unidades de conservação: REBIO de Una (verde claro), REVIS (verde mais claro). Fonte: A= Wikipédia; B= IESB ..	19
Figura 5-	Representação gráfica da parcela de 16 ha (400 x 400) com uma subparcela de 1 ha (100 x 100) de <i>M. maxima</i> na RPPN Nova Angélica, Una-BA .....	21
Figura 6-	Gráfico da função univariada para os 281 adultos de <i>Manilkara maxima</i> na parcela de 16 ha na RPPN Nova Angélica, Una-BA. A linha preta contínua indica a distribuição espacial dos jovens. A linha verde indica a média esperada ao acaso caso a distribuição dos indivíduos fosse totalmente randômica e as linhas em vermelho representam os limites superior e inferior das permutações (representando os limites do esperado ao acaso nas 10000 randomizações) .....	29

Figura 7-	Gráfico da função univariada para os 83 jovens de <i>Manilkara maxima</i> na subparcela de 1 ha na RPPN Nova Angélica, Una-BA. A linha preta contínua indica a distribuição espacial dos jovens. A linha verde indica a média esperada ao acaso caso a distribuição dos indivíduos fosse totalmente randômica e as linhas em vermelho representam os limites superior e inferior das permutações (representando os limites do esperado ao acaso nas 10000 randomizações) .....	29
Figura 8-	Representação gráfica da distribuição espacial de indivíduos adultos (em verde) na parcela 400 x 400 e jovens (em vermelho) no centro da parcela de 100 x 100 de <i>M. maxima</i> na RPPN Nova Angélica, Una-BA .....	30
Figura 9-	Gráfico da função bivariada para os indivíduos adultos e jovens de <i>Manilkara maxima</i> na subparcela de 1 ha na RPPN Nova Angélica, Una-BA. A linha preta contínua indica a distribuição espacial dos adultos e jovens. A linha verde indica a média esperada ao acaso caso a distribuição dos indivíduos fosse totalmente randômica e as linhas em vermelho representam os limites superior e inferior das permutações (representando os limites do esperado ao acaso nas 10000 randomizações) .....	30
Figura 10-	Análise da estrutura genética espacial em indivíduos adultos (A) e jovens (B) em uma população natural de <i>M. maxima</i> , na RPPN Nova Angélica, Una-BA. A linha contínua indica o coeficiente médio de parentesco e as pontilhadas representam os limites superior e inferior do intervalo de confiança de 95% a partir de 10000 permutações.....	32

Figura 11- Representação gráfica da análise de paternidade de 10 indivíduos jovens de *M. maxima* na parcela de 16 ha na RPPN Nova Angélica, Una-BA. Os scores representam as famílias (“pai”, “mãe” e filho), sendo os adultos iniciados com a letra (A) e os jovens com a letra (J). A localização entre os jovens (J 66 e J 67) são próximas, assim como para (J 26 e J 28) e (J 47 e J 20)..... 34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características de seis primers de <i>Manilkara multifida</i> transferidos em <i>Manilkara maxima</i> , com amplitude alélica e temperatura de hibridação (Tm).....	22
Tabela 2-	Estimativas de variabilidade genética de <i>Manilkara maxima</i> em uma população (adultos e jovens) na RPPN Nova Angélica, BA a partir da transferência de seis locos micros-satélites desenvolvidos para <i>M. multifida</i> .....	26
Tabela 3-	Estimativas de variabilidade genética em adultos e jovens de <i>Manilkara maxima</i> em uma população na RPPN Nova Angélica, BA .....	28
Tabela 4-	Análise de paternidade de <i>Manilkara maxima</i> . Delta e “LOD-score” com nível de confiança de 95% .....	33
Tabela 5-	Distância de fluxo gênico via pólen e sementes de <i>Manilkara maxima</i> na RPPN Nova Angélica, Una-BA .....	34

## 1. INTRODUÇÃO

*Manilkara maxima* T.D. Penn. é uma arbórea nativa e endêmica da Floresta Atlântica do sul da Bahia, conhecida como maçaranduba vermelha ou parajú. Pertence à família Sapotaceae e tem grande potencial econômico devido à boa qualidade de sua madeira (PESSOA *et al.*, 2011; ALMEIDA Jr., 2010). Espécies do gênero *Manilkara* são polinizadas por abelhas, morcegos, pássaros (AZEVEDO *et al.*, 2007; PENNINGTON, 2004 ) e primatas como o *Callithrix kuhlii* (RABOY *et al.*, 2008) e são dispersadas por morcegos, pássaros e primatas (AZEVEDO *et al.*, 2007; PENNINGTON, 2004). Além disso, é bastante requisitada em projetos de restauração florestal, pois seus recursos são atrativos para a fauna (PESSOA *et al.*, 2011).

Atualmente, esta espécie encontra-se ameaçada de extinção na categoria vulnerável (PIRES O'BRIEN, 1998; ALMEIDA Jr., 2010), sendo importante para estudos sobre a diversidade em remanescentes de Mata Atlântica em Una, no sul da Bahia, devido a suas interações mutualísticas com animais endêmicos e ameaçados de extinção como, o mico-leão-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (OLIVEIRA *et al.*, 2009; KIERULFF *et al.*, 2008) e o “sagui de juba preta” (*Callithrix kuhlii*) (RYLANDS & KIERULFF, 2008; RABOY *et al.*, 2008).

A Mata Atlântica é um bioma brasileiro com elevada diversidade e riqueza de espécies, altos níveis de endemismo em suas diversas formações florestais e ecossistemas associados, sendo considerada um “hotspot” (MITTERMEIER *et al.*, 1998; MYERS *et al.*, 2000; LAURANCE, 2009). Toda essa biodiversidade foi, e continua sendo, bastante impactada por ações humanas (MYERS *et al.*, 2000; FARIA *et al.*, 2007; MARIANO-NETO, 2004). A devastação dos seus recursos foi impulsionada historicamente por diversos ciclos econômicos de exportação, expansão urbana descontrolada (DEAN, 1997), pecuária extensiva, exploração madeireira, além de outros fatores (ALGER & CALDAS, 1996; GALINDO-LEAL & CÂMARA, 2003; TABARELLI *et al.*, 2004). Isso resultou em uma destruição significativa da cobertura vegetal original.

Os remanescentes de florestas naturais estão estimados em torno de 11,4% e 16%, e em sua maioria, encontram-se como pequenos fragmentos

menores de 50 ha rodeados por uma paisagem dominada por cultivos agrícolas e ocupação humana (PARDINI, 2001; FARIA, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2009). Como consequência, a fragmentação florestal reduz e isola ambientes favoráveis à sobrevivência das populações, comprometendo a integridade dos ecossistemas (KAGEYAMA *et al.*, 1998). Dessa forma, esses ambientes alterados podem influenciar negativamente as interações biológicas entre espécies animais e vegetais, como por exemplo, os processos de polinização e dispersão (YOUNG *et al.*, 1996; KAGEYAMA *et al.*, 1998; HARDY *et al.*, 2006).

Animais polinizadores e dispersores são responsáveis pelo movimento de genes entre e dentro de populações, organizando a distribuição espacial dos indivíduos em agregado, aleatório ou uniforme. Em adição, o parentesco e as características reprodutivas dos indivíduos poderão influenciar fortemente os padrões de fluxo gênico (JONES *et al.*, 2006), a demografia e a agregação de indivíduos em estrutura de família (ENNOS, 1994; AUSTERLITZ *et al.*, 2004; HARDY *et al.*, 2006), contribuindo para a perda gradativa da variabilidade genética (AZEVEDO *et al.*, 2007) nas futuras gerações.

Nesse sentido, o conhecimento dos processos de polinização e dispersão presentes em remanescentes florestais é de ampla significância. E dependendo do status de conservação em que as populações naturais se encontram, é possível inferir sobre os processos evolutivos que moldaram as medidas de diversidade genética atual. Além disso, gera evidências sobre o potencial adaptativo das espécies em responder às alterações no habitat, servindo de modelo para comparação entre as espécies intrapopulacional ou entre populações nos diferentes ambientes, sejam eles naturais ou fragmentados.

Estudos sobre forrageamento de polinizadores e frugívoros mostram uma relação estreita entre distâncias do movimento de pólen e sementes em relação às plantas fontes (CHASE *et al.*, 1996; JORDANO & GODOY, 2002; GARCÍA *et al.*, 2007). Dessa forma, a distribuição espacial dos indivíduos dentro e entre populações influenciarão futuros cruzamentos, que dependendo da relação de parentesco entre eles, resultará em estrutura genética espacial (HAMRICK & NASON, 1996; EPPERSON, 2003). Por outro lado, as dispersões a longas distâncias (FRAGOSO *et al.*, 2003; DICK *et al.*, 2007) contribuem para o aumento da variabilidade genética entre os ambientes.

Avanços na biologia molecular de plantas, a partir de ferramentas moleculares, juntamente com estudos de frugivoria, contribuíram para o conhecimento do movimento de genes e suas consequências em populações de plantas (SORK *et al.*, 1999; JORDANO & GODOY, 2002). Dentre as ferramentas, os marcadores microssatélites são os mais indicados por serem altamente informativos (MORGANTE & OLIVIERI, 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; BORÉM & CAIXETA, 2006), possibilitando inferir precisamente sobre eventos de dispersão e distribuição da variabilidade genética em remanescentes de florestas.

Com o intuito de ampliar o conhecimento e entendimento sobre o movimento de genes em arbóreas tropicais, este estudo teve como objetivo estimar através de microssatélites o fluxo gênico contemporâneo e a estrutura genética espacial em uma população de *Manilkara maxima* T.D. Penn. em remanescente em bom estado de conservação de Mata Atlântica no sul da Bahia, Brasil.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Investigar com auxílio de marcadores microssatélites a distribuição espacial dos alelos e o fluxo gênico contemporâneo de indivíduos da espécie arbórea *Manilkara maxima* T.D. Penn. em uma população amostrada em paisagem com elevada porcentagem de cobertura florestal.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

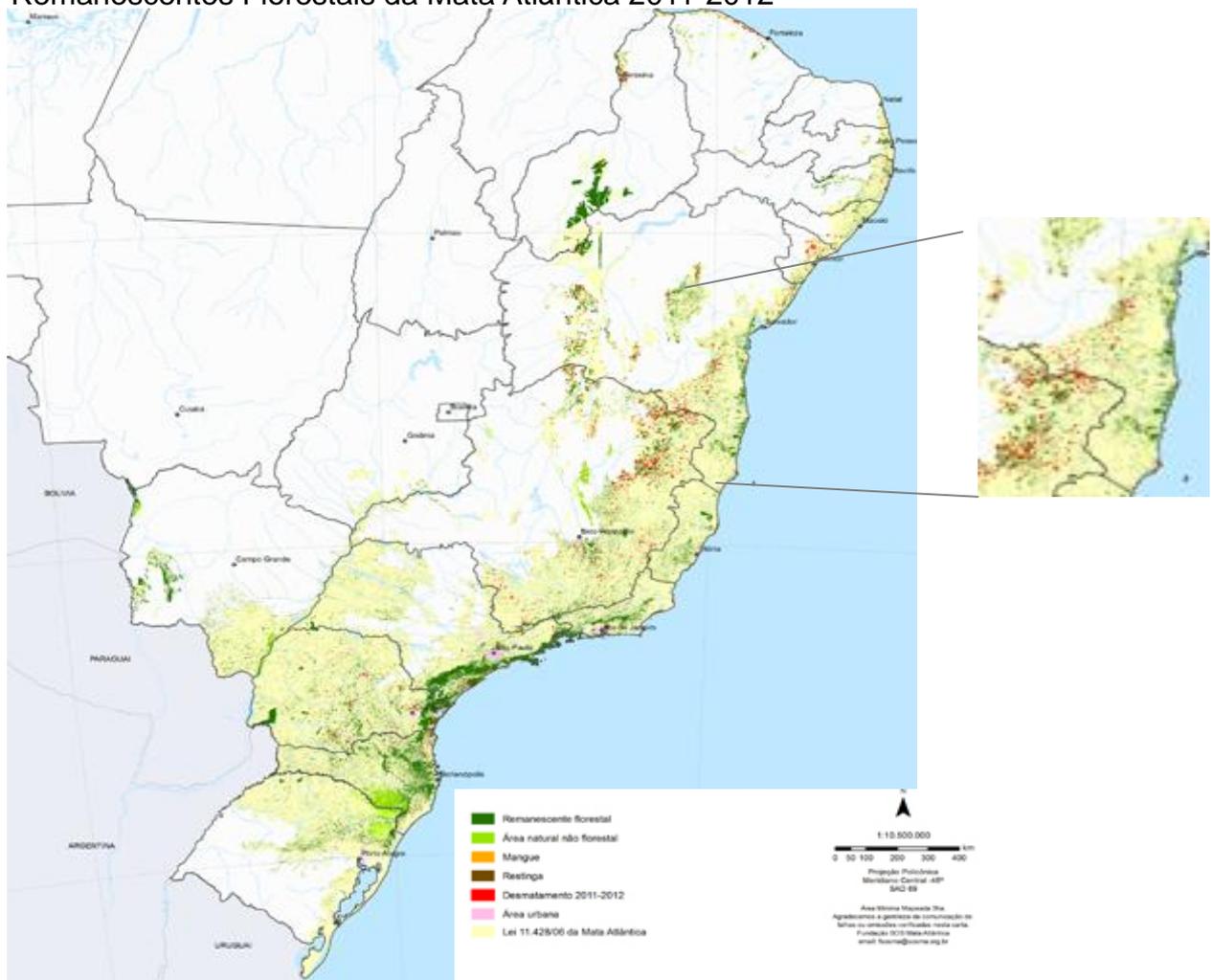
- 1) Verificar a transferência de primers de *M. multifida* para *M. maxima*.
- 2) Investigar a densidade e a estrutura genética espacial em uma população de *M. maxima* localizada no município de Una-BA considerando diferentes gerações.
- 3) Avaliar o fluxo gênico direto em *M. maxima* através da análise de paternidade de uma população localizada no município de Una-BA.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. A ESPÉCIE

A espécie arbórea *Manilkara maxima* T.D. Penn. pertence a família Sapotaceae e é conhecida vulgarmente como maçaranduba vermelha, maçaranduba do brejo ou parajú. É nativa e endêmica do domínio fitogeográfico da Mata Atlântica do sul da Bahia, Brasil (PENNINGTON, 1990; THOMAS *et al.*, 2003; ALMEIDA Jr., 2013) (Figura 1). Segundo Pennington (1990), *M. maxima* tem preferência por áreas de restinga, mas se encontra também ao norte do rio Jequitinhonha, nas florestas de terras baixas, uma das tipologias conhecidas dos remanescentes de floresta ombrófila densa (MARIANO-NETO, 2004).

Remanescentes Florestais da Mata Atlântica 2011-2012



**Figura 1:** Remanescentes florestais da Mata Atlântica no ano de 2011-2012. Fonte: Adaptado da Fundação SOS Mata Atlântica/INPE.

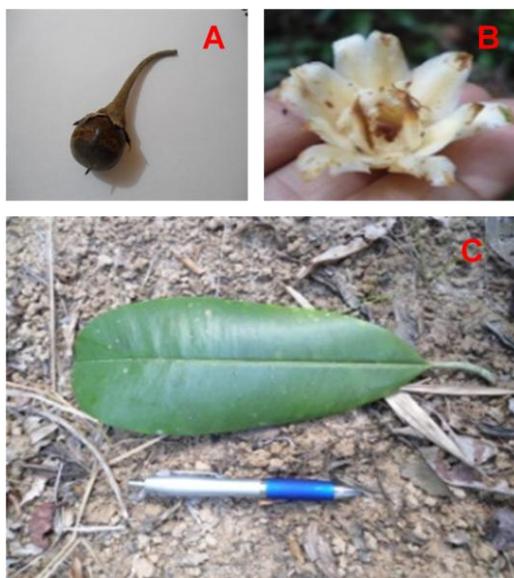
*M. maxima* tem como características a presença de caule acinzentado com lenticelas proeminentes e casca interna avermelhada contendo látex branco abundante, chegando a medir de 20 a 35 m de altura (Figura 2); estípulas ausentes; folhas grandes, de forma obovada e cor marrom avermelhada na porção abaxial; botão esverdeado e flores solitárias hermafroditas de cor branca e consideravelmente maiores do que qualquer outra espécie conhecida do gênero; além do fruto de cor amarronzada quando maduro (PENNINGTON, 1990; ALMEIDA Jr., 2010; PESSOA *et al.*, 2011) (Figura 3).



**Figura 2:** Caule acinzentado com lenticelas proeminentes de *M. maxima*. Destaca-se a casca interna avermelhada contendo látex branco abundante (indicado pela seta vermelha). Fonte: Daniele França.

A floração ocorre entre os meses de maio e novembro e a frutificação acontece entre os meses de agosto e novembro, registrados também entre janeiro e junho (ALMEIDA Jr., 2010). Entretanto, Pessoa *et al.*, (2011) registraram floração e frutificação anuais e estendidas, com floração entre janeiro e dezembro, com exceção dos meses de maio e junho, enquanto a frutificação acontece durante todo o ano. Espécies *Manilkara* são polinizadas

por abelhas, morcegos, pássaros (PENNINGTON, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2007) e primatas, como *Callithrix kuhlii* (RABOY *et al.*, 2008) e são dispersadas por morcegos, pássaros e primatas (PENNINGTON, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2007).



**Figura 3:** Partes de *M. maxima*. (A) Fruto maduro. (B) Flor solitária de cor branca. (C) Parte adaxial da folha. Fonte: Daniele França.

No século XX, o desmatamento e a exploração madeireira no Brasil alcançaram níveis alarmantes, forçando espécies a sobreviver em pequenos ambientes fragmentados (TABARELLI & GASCON, 2005; CAMPANILI & SCHAFFER, 2010). Por exemplo, na região sul da Bahia, um dos locais de abrangência da espécie *M. maxima*, a derrubada de áreas florestadas ganhou destaque desde a década de 40, alcançando seu ápice na década de 70, com a abertura de estradas que cortava a região, como por exemplo, a construção da BR-101 (ALGER & CALDAS, 1996; MARIANO-NETO, 2004; FARIA *et al.*, 2009). Em adição, no século XIX o cacau era a principal atividade econômica da região (GOUVÊA *et al.*, 1969), a qual colocava o Brasil em destaque no cenário econômico internacional. Com a crise da lavoura cacauera no final da década de 90 (DIAS, 2001), muitos cacauicultores diversificaram sua cultura. Eles passaram a explorar de maneira exacerbada outros produtos da floresta, como por exemplo, madeira de espécies nativas como a braúna (*Melanoxylon brauna*), jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra*), maçarandubas (*Manilkara* spp.),

além de outras arbóreas (ALGER & CALDAS, 1996; MARIANO-NETO, 2004). Entretanto, nos últimos anos, o ritmo de desmatamento tem diminuído (CAMPANILI & SCHAFFER, 2010).

Apesar da exploração madeireira ser proibida no estado da Bahia, algumas serrarias ainda continuam utilizando madeira de espécies nativas e endêmicas de forma ilegal, o que pode favorecer a redução do número de seus indivíduos (ALGER & CALDAS, 1996; MARIANO-NETO, 2004). *M. maxima*, assim como outras espécies da família Sapotaceae, é ainda muito procurada devido ao látex e à resistência de sua madeira. A espécie é usada para a cobertura de casas e construção de cercas. Além de ser resistente aos cupins, é também destacada para uso ornamental e enriquecimento em restaurações florestais por ser atrativa de fauna nativa (ALMEIDA Jr., 2010; PESSOA *et al.*, 2011).

*M. maxima* é muito comum nas localidades do município de Una no sul da Bahia, sendo encontrada em locais onde não houve corte seletivo, tanto em solos arenosos quanto em solos férteis (MARIANO-NETO, 2004; PESSOA *et al.*, 2011). Já em áreas de cabruca (sistema agroflorestal de cultivo do cacau com a manutenção de algumas árvores nativas para sombreamento), o número de árvores nativas da família Sapotaceae é menor. A justificativa pode ser devido à germinação lenta e irregular das sementes, além de algumas mudas serem geralmente eliminadas durante a remoção da vegetação rasteira (SAMBUICHI, 2006; PESSOA *et al.*, 2011).

Atualmente, devido ao corte seletivo de madeira em algumas localidades e sua abrangência restrita, *M. maxima* encontra-se na categoria de espécie “vulnerável” (VU, B1 + 2c) de acordo com a lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (PIRES O'BRIEN, 1998), a qual leva em consideração além de outros estudos, a distribuição geográfica e consultas a listagens florísticas.

Temple (1997) sugere que espécies de árvores tropicais endêmicas ou ameaçadas possam persistir em comunidades e serem indicadoras da integridade do ecossistema, além de serem importantes para a manutenção de grupos animais que compartilham ambientes semelhantes (GARDEM *et al.*, 2009). *M. maxima* é uma delas, pois estudos mostram que ela se enquadra como espécie chave para a conservação “*in situ*” de recursos genéticos

florestais devido à interação mutualística com mamíferos de pequeno porte. A espécie é bastante apreciada como alimento por dois primatas endêmicos da floresta Atlântica do sul da Bahia, ambos na lista vermelha da IUCN (KIERULFF *et al.*, 2008; RYLANDS & KIERULFF, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Um deles, é o “sagui de juba preta” (*Callithrix kuhlii*), também endêmico do noroeste de Minas Gerais, que se alimenta do néctar de suas flores (RABOY *et al.*, 2008) e o outro é o “mico-leão-da-cara-dourada” (*Leontopithecus chrysomelas*) que também se alimenta de néctar e a utiliza como local de abrigo (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Além disso, *M. maxima* é destacada como uma das 55 espécies de árvores consideradas “extremamente valiosas” para a conservação do *L. chrysomelas* pela alta frequência do uso dos recursos em habitats de floresta madura, cabruca e floresta secundária (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Apesar da importância de muitas espécies arbóreas tropicais, há uma carência e necessidade da realização de trabalhos sobre a genética populacional e a funcionalidade dessas espécies. Com *M. maxima* não é diferente, assim como, para outras espécies do mesmo gênero (ALMEIDA Jr, 2010). Destacam-se trabalhos utilizando *M. maxima*: fenologia (PESSOA *et al.*, 2011); diversidade genética no sul da Bahia (GANZHORN, 2010); densidade e distribuição espacial de três espécies de *Manilkara* no sul da Bahia, incluindo *M. maxima* (LANTYER SILVA *et al.*, 2009); anatomia foliar para auxiliar na identificação de 11 espécies de *Manilkara* distribuídas em áreas de floresta Atlântica do Nordeste brasileiro e 1 espécie proveniente de áreas de floresta Amazônica (ALMEIDA Jr, 2010); riqueza de fungos anamorfos na serrapilheira de três plantas endêmicas da Mata Atlântica do sul da Bahia, incluindo *M. maxima* (MAGALHÃES *et al.*, 2011), além de listagens florísticas (THOMAS *et al.*, 1998; THOMAS *et al.*, 2003; PESSOA, 2008).

### **3.2. MATA ATLÂNTICA**

A Mata Atlântica representa um conjunto de formações florestais, além de campos naturais, restingas, manguezais e outros tipos de vegetação considerados ecossistemas associados (RIZZINI, 1997; CAMPANILI & SCHAFFER, 2010). Situada principalmente sobre a parte leste do território

brasileiro e ocupando uma extensa área litorânea que vai desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, abrangia uma área de aproximadamente 1.300.000 Km<sup>2</sup> (GALINDO-LEAL & CÂMARA, 2005; CAMPANILI & SCHAFFER, 2010).

Pelo fato da Mata Atlântica estar localizada em diferentes latitudes, apresenta ao longo de sua extensão territorial, uma variação de solos, topografias e climas, resultando em uma composição heterogênea da sua biota, (MANTOVANI, 1993). É conhecida como uma das maiores e mais importantes florestas tropicais do continente sul-americano, com altos níveis de endemismo (MORI *et al.*, 1981; THOMAS *et al.*, 1998; SILVA & CASTELLETTI, 2003; SILVA *et al.*, 2004). Por ser um dos biomas mais ricos em termos de diversidade biológica, e que nos últimos anos sofreu uma redução drástica de sua extensão territorial, é reconhecida internacionalmente como uma das oito áreas prioritárias para a conservação (MITTERMEIER *et al.*, 1998; MYERS *et al.*, 2000; LAURANCE, 2009). Além disso, presta serviços ambientais importantes, principalmente relacionados à produção e à conservação dos recursos hídricos, proteção do solo e regulação do clima (CAMPANILI & SCHAFFER, 2010).

Apesar da sua importância, a Mata Atlântica foi um dos biomas brasileiros mais impactados pela ação humana (BRASIL-MMA, 2012). A perda da cobertura original e a degradação dos recursos naturais é resultado de atividades antrópicas iniciadas desde o período de 1500, durante a colonização do território brasileiro com a exploração do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) (ALGER & CALDAS, 1996; GALINDO-LEAL & CÂMARA, 2003) e que prevalece até os dias de hoje. Dentre elas, se destacam a expansão humana (DEAN, 1997), influência dos grandes ciclos econômicos (ALGER & CALDAS, 1996), a caça (PARDINI, 2001), pecuária (COIMBRA-FILHO & CÂMARA, 1996), o extrativismo e a instalação e desenvolvimento das cidades (CAMPANILI & SCHAFFER, 2010). Entretanto, devido à diferença na composição do solo e histórico de exploração de suas florestas, uma parte considerável de sua extensão territorial se manteve ao longo dos anos.

As fisionomias remanescentes de Mata Atlântica encontram-se atualmente fragmentadas em pequenas “ilhas” de diferentes tamanhos e muito separadas entre si (CAMPANILI & SCHAFFER, 2010; GASCON *et al.*, 2000).

Estimadas em torno de 11,4% e 16% (RIBEIRO *et al.*, 2009), as manchas remanescentes de florestas encontram-se imersas em uma paisagem dominada por pastagens, cultivos agrícolas e áreas urbanas. Apesar de muitos fragmentos resultantes serem menores que 50 ha (RIBEIRO *et al.*, 2009), algumas dessas áreas de florestas ainda mantêm estágios intermediários de conectividade, permitindo a sobrevivência de grande parte das espécies presentes.

Algumas manchas de florestas no sul da Bahia não foram exploradas por estarem localizadas em terras baixas próximas ao litoral e situadas em áreas sobre os tabuleiros, os quais possuem solos considerados pobres para a agricultura (MARIANO-NETO, 2004). Resultando dentre outras respostas, na sobrevivência de diversas espécies que dependem de grandes áreas de florestas ou espécies animais que conseguem atravessar a paisagem variegada (PARDINI, *et al.*, 2009). O sul da Bahia também sustenta níveis elevados de riqueza e biodiversidade nativa (AMORIM *et al.*, 2009), além de proporcionar habitat para espécies endêmicas e ameaçadas de extinção (RABOY *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Ao longo dos anos, muito desse potencial ainda é descrito na Bahia e em outros estados brasileiros porque remanescentes de florestas estão localizados em propriedades particulares ou em áreas públicas de proteção integral (ALGER & ARAÚJO, 1996; THOMAS *et al.*, 1998; RAMBALDI & OLIVEIRA, 2003). Entretanto, essa biodiversidade restante não se encontra totalmente protegida devido a problemas cruciais presentes dentro e entre essas áreas, como falta de pessoal qualificado, financiamento suficiente para compra de equipamentos de monitoramento, implementação de planos de manejo, conflito de terras dentro e no entorno das áreas (GALETTI, 2001; LAGOS & MULLER, 2007).

Por outro lado, pelo fato dos remanescentes de Mata Atlântica não estarem distribuídos uniformemente ao longo de sua extensão territorial e alguns encontrarem-se isolados, a funcionalidade natural nem sempre é mantida (FAHRIG, 2003; CAMPANILI & SCHAFFER, 2010). E um dos processos afetados diretamente é o fluxo gênico dentro e entre populações arbóreas.

Diversas espécies de árvores dependem da presença efetiva de animais polinizadores e dispersores nos ambientes. A falta deles implica em consequências negativas a curto e longo prazos tanto para espécies animais quanto para vegetais. Alterando no primeiro instante a dinâmica populacional das espécies, que futuramente irá influenciar a estrutura genética (HAMRICK & GODT, 1997; KAGEYAMA *et al.*, 1998; HARDY *et al.*, 2006). Nesse sentido, esses remanescentes de Mata Atlântica podem ser avaliados através de estudos associando processos demográficos aos genéticos em espécies representativas, com a finalidade de conservação em longo prazo (KAGEYAMA *et al.*, 1998; SEZEN *et al.*, 2005).

### **3.3. MARCADORES MOLECULARES**

Para que populações naturais de determinada espécie sejam conservadas em longo prazo de maneira eficiente, é necessário o conhecimento dos seus remanescentes. Levando em consideração padrões espaciais baseados na filogenia, distribuição geográfica, variabilidade e estrutura genética presentes na espécie, dentre outras (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; MARCHIORETTO *et al.*, 2004; SEZEN *et al.*, 2005).

O estudo da genética de populações pode ser feito através de ferramentas moleculares. Dentre elas, destacam-se os marcadores moleculares, os quais detectam a variabilidade genética diretamente ao nível da sequência de DNA. Em adição, o surgimento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) na década de 80 (MULLIS & FALOONA, 1987) possibilitou novas perspectivas e um melhor planejamento em programas de uso e conservação desse “pool gênico” (GEPTS, 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; ZUCCHI, 2002; CAVALLARI, 2004). Os marcadores moleculares possibilitam inferências precisas sobre fluxo gênico, estrutura genética espacial, melhoramento genético de plantas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; KAGEYAMA *et al.*, 2001), além de outros aspectos.

### **3.4. MICROSSATÉLITES**

Os microssatélites foram relatados pela primeira vez em humanos por volta da década de 80 (LITT & LUTY, 1989) e em plantas, no início dos anos 90 por Condit & Hubbell (1991), estudando seis espécies arbóreas tropicais.

Os microssatélites, também chamados de SSRs (Simple Sequence Repeats) são pequenas sequências de DNA genômico repetidas em tandem, geralmente encontrados em regiões não codificadoras, podendo variar de 01 até 08 nucleotídeos (TAUTZ, 1989; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; CHAMBERS & MACAVOY, 2000).

Para estudos de genética de populações, os microssatélites são os marcadores mais indicados e largamente utilizados em estudos e programas de manejo para a conservação genética de populações naturais (RAFALSKI *et al.*, 1996; ZUCCHI, 2002; SCHNEIDER *et al.*, 2003). Eles são os que mais se aproximam do marcador ideal devido as suas características em genomas eucariotos. Trata-se de marcadores altamente polimórficos devido à alta taxa de mutação nos locos, multialélicos, codominantes, distribuídos ao acaso, abundantes no genoma e geralmente conservados entre indivíduos da mesma espécie (LITT & LUTY, 1989; MORGANTE & OLIVIERI, 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; POWELL *et al.*, 1996), permitindo assim, sua reproducibilidade em estudos genéticos de populações.

Em plantas, os microssatélites têm sido muito utilizados em estudos de genética de populações, com destaque para habitats fragmentados (ZUCCHI, 2002; MORAES, 2012) por ser uma ferramenta bastante eficiente na compreensão de parâmetros relacionados ao sistema de cruzamento, tamanho efetivo populacional, análise de parentesco e estrutura genética (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; YOUNG *et al.*, 1996; PARKER *et al.*, 1998).

Entretanto, como todo tipo de marcador, os microssatélites também apresentam limitações. E a maior delas está ligada ao desenvolvimento e seleção prévia dos *primers* específicos (oligonucleotídeos sintetizados *in vitro*) para cada espécie. As limitações são tempo, pessoal especializado e custo elevado. Esses fatores levam pesquisadores à estratégia de transferência de *primers* entre espécies evolutivamente relacionadas (CAIXETA *et al.*, 2006) devido à estabilidade das regiões flangeadoras, mostrando resultados satisfatórios.

Diversas espécies vegetais já foram estudadas destacando o uso de marcadores moleculares e sua abordagem em questões ecológicas vem sendo incorporada devido às melhorias nas análises genéticas e nos métodos de genotipagem (SELKOE & TOONEN, 2006). No caso de espécies do gênero *Manilkara*, apesar de dados moleculares ainda serem bastante escassos (ALMEIDA Jr. 2010), destacam-se os trabalhos de Almeida Jr. (2010) com a seleção de marcador molecular ISSR para estudos futuros de diversidade genética em diferentes espécies de *Manilkara*; Azevedo *et al.*, (2007) estudando a estrutura genética de *Manilkara huberi* (Ducke) Standl., uma espécie arbórea nativa da floresta Amazônica partir de microsatélites; Moraes (2012) desenvolvendo e caracterizando *primers* de microsatélite para a espécie nativa e endêmica da Bahia, *Manilkara multifida*.

### 3.5. FLUXO GÊNICO E ANÁLISE DE PATERNIDADE

Segundo Slatkin (1981, 1985) o fluxo gênico é definido como o mecanismo resultante do movimento de alelos de uma população para outra, incluindo todos os movimentos de gametas, propágulos e indivíduos que trocam genes na distribuição espacial (NEIGEL, 1997).

Em ambientes fragmentados, devido à heterogeneidade ambiental, o movimento natural do fluxo gênico de algumas espécies através dos processos de polinização e dispersão de sementes pode sofrer alteração, se tornando restrito ou ausente (HARDY *et al.*, 2006), interferindo nos padrões demográficos e na estrutura genética dessas populações. Nesse sentido, a incorporação de fatores ecológicos no estudo de fluxo gênico surgiu da necessidade, em parte, de biólogos da conservação determinarem se a alteração em determinado hábitat estava contribuindo para o isolamento populacional (SORK *et al.*, 1999).

A dispersão de pólen juntamente com a dispersão de sementes, são estágios fundamentais no estudo de fluxo gênico de plantas, pois é através desses processos que a informação genética é passada para os descendentes, influenciando a demografia e a estrutura genética nesses ambientes (ENNOS, 1994; AUSTERLITZ *et al.*, 2004). Para estimar precisamente se o movimento dos genes é via pólen ou semente, métodos diretos ou indiretos de quantificação de fluxo gênico são realizados. Ambos podem utilizar marcadores

genéticos aloenzimáticos e microssatélites, pois eles são capazes de detectar a variação alélica em associação com modelos estatísticos (DEVLIN & ELLSTRAND, 1990; ADAMS & BIRKES, 1991; ALDRICH & HAMRICK, 1998; NASON *et al.*, 1998).

Os métodos diretos referem-se ao fluxo gênico contemporâneo e as primeiras observações foram baseadas no movimento de distância de pólen por animais (SORK *et al.*, 1999). Segundo Chase *et al.*, (1996), a maioria dos estudos em plantas se concentrava no fluxo gênico mediado por pólen e sucesso reprodutivo masculino. Entretanto, modelos baseados na dispersão de genes via sementes utilizando análise de maternidade também foram desenvolvidos (SCHNABEL *et al.*, 1998), conhecidos como marcadores de DNA mitocondrial (mtDNA) e de DNA cloroplastidial (cpDNA). Em adição, com o desenvolvimento de modelos estatísticos e de análise de paternidade na década de 80 tornou-se possível descrever a estrutura do movimento de genes através de sementes (SORK *et al.*, 1999).

Estudos baseados em modelos probabilísticos têm sido utilizados para estimar separadamente o movimento de genes entre e dentro de populações (SORK *et al.*, 1999). Dentro de populações, a análise de paternidade por meio dos microssatélites é realizada comparando genótipos multilocos de indivíduos adultos e jovens, podendo revelar inferências precisas sobre os pais da prole de sementes e plântulas (HAMRICK & SCHNABEL, 1985; ALDRICH & HAMRICK, 1998; NASON *et al.*, 1998; SORK *et al.*, 1999). Sob o aspecto interpopulacional, a análise de paternidade pode inferir sobre as taxas de imigração de pólen em populações pequenas e isoladas ou continuamente distribuídas (DEVLIN & ELLSTRAND, 1990). Em adição, Nason *et al.*, (1998) destacam que todos os genes em populações-fonte de fluxo podem ser identificados e amostrados, respectivamente através de frequência alélica e genótipos multilocos.

Os métodos indiretos referem-se ao fluxo gênico histórico e a abordagem mais convencional é utilizar as medidas de estrutura genética populacional como estimativas indiretas de troca de genes por geração em uma dada população (NEIGEL, 1997). Eles têm a desvantagem de não distinguir facilmente se o fluxo gênico seu deu via pólen ou semente. (SORK *et al.*, 1999; AUSTERLITZ *et al.*, 2004). Segundo Sork *et al.*, (1999) o estudo

indireto de fluxo gênico tem sido realizado abordando os modelos: 1) de metapopulações, não necessariamente levando em consideração o contexto da paisagem e sim a dinâmica de extinção e colonização. Este não é o mais usado pela dificuldade em mensurar as taxas de colonização, extinção e migração em populações (HUSBAND & BARRETT, 1996); 2) de mosaico de paisagem, no qual os tipos de hábitat aliados à qualidade da paisagem dão estimativas mais precisas sobre os padrões históricos. Ele incorpora informação espacial e de conectividade interpopulacional; 3) de ilhas infinitas de Sewall Wright (1951), através de estatísticas  $F$ , pressupondo que tamanho populacional e taxa de migração são uniformes e constantes no tempo e no espaço e que todas as populações contribuem igualmente para a troca de genes. Apesar do modelo de ilha ser o mais convencional, ele não reflete o movimento contemporâneo dos genes ou as alterações no processo de dispersão entre populações, mas fornece informações valiosas sobre efeitos cumulativos de fluxo gênico na estrutura genética de populações (SORK *et al.*, 1999).

### **3.6. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL**

Segundo Hamrick (1982), estrutura genética espacial (EGE) de uma população refere-se à distribuição não aleatória dos alelos e genótipos no espaço e no tempo, resultante da ação de forças evolutivas que atuam dentro do contexto de cada espécie, limitando a dispersão eficiente de genes via sementes ou via pólen (HARDY *et al.*, 2006).

A EGE é um conceito fundamental na compreensão da variabilidade genética, pois estima através de parâmetros genéticos a movimentação dos genes dentro (intrapopulacional) e entre (interpopulacional) populações (EPPERSON & ALLARD, 1989). Ela é resultante da ação e interação de mecanismos evolutivos e processos ecológicos, da biologia reprodutiva da espécie, estrutura demográfica, composição e abundância de polinizadores e dispersores (LOVELESS & HAMRICK, 1984).

Os processos ecológicos naturais podem ser alterados por ações antrópicas e os danos às espécies serem irreversíveis e diagnosticados em curto e longo prazos. Uma das ações é a redução no tamanho efetivo populacional, o qual afeta a dinâmica da população e frequentemente modifica

sua estrutura genética (HARDY *et al.*, 2006; MOURA, 2007). Nesse caso, a diversidade genética diminui com a perda imediata de alelos por deriva, favorecendo a fixação de alelos raros ou deletérios (BARRETT & KOHN, 1991; YOUNG *et al.*, 1996). Outra consequência é que uma menor densidade de indivíduos aumenta a probabilidade de endogamia dentro da população, gerada por cruzamento entre indivíduos correlacionados, ou dependendo da espécie, por autofecundação. Somado a esse fato, os efeitos de seleção favorecerão a fixação de determinados alelos com maior valor adaptativo, aumentando ou diminuindo as diferenças entre os indivíduos (YOUNG *et al.*, 1996).

As técnicas de biologia molecular através dos marcadores genéticos associadas a ferramentas computacionais têm sido utilizadas em estudos sobre os níveis de diversidade (MORAES, 2012) e distribuição de EGE de arbóreas tropicais (LEAL, 2013). Esses estudos aliam também conceitos de ecologia e genética populacional, os quais são fundamentais para a conservação de espécies arbóreas, presentes entre e dentro de populações.

Para caracterizar a estrutura genética interpopulacional através de marcadores codominantes, a abordagem pode ser realizada utilizando as estatísticas  $F$  de Wright (WRIGHT, 1951; 1965), o coeficiente de coancestralidade de Cockerham (COCKERHAM, 1969) e análise da diversidade genética em populações subdivididas (NEI, 1973). Já para a EGE intrapopulacional, são mais comumente usadas as análises de autocorrelação espacial, através do índice  $I$  de Moran e de coeficientes de coancestria, parentesco, fraternidade, além da comparação de padrões de variação genética e distribuição geográfica (SOKAL & ODEN, 1978; CAVERS *et al.*, 2005; TARAZI, 2009)

Em ambientes fragmentados, a distribuição dos indivíduos no tempo e no espaço pode passar por mudanças. A limitação no fluxo de indivíduos da mesma espécie entre as populações dos fragmentos pode torná-la isolada e estruturada geneticamente. Entretanto, medidas mitigadoras podem restabelecer o fluxo de genes entre essas populações, retardando essa diferenciação ou minimizando as consequências (SORK *et al.*, 1999; TARAZI, 2009).

Dessa forma, informações da dinâmica e estrutura das populações são necessárias para que se promova a conservação da biodiversidade de maneira eficiente tanto *in situ* quanto *ex situ* (KAGEYAMA *et al.*, 2001). Os dados genéticos possibilitam a base do conhecimento sobre processos que possibilitam a reprodução contínua e a sobrevivência de populações em longo prazo (MARTINS, 1987). Em adição, para a conservação *ex situ*, esses dados são úteis na seleção e coleta de sementes ou mudas de árvores nativas para programas de melhoramento e restauração florestal, maximizando a diversidade entre os indivíduos (SHAPCOTT, 1995; MARTINS *et al.*, 2006).



A RPPN Nova Angélica representa um dos 48 sítios de amostragem do projeto SISBIOTA/CNPq (Funcionalidade ecológica de ambientes florestais em paisagens antropizadas). Este projeto está sendo realizado em parceria, por um grupo de pesquisadores da Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC; Universidade Federal de Pernambuco-UFPE; Universidade de Brasília-UNB; Universidade federal da Bahia-UFBA e Universidade de São Paulo-USP, na porção nordeste do Bioma Mata Atlântica.

Devido à dificuldade em mapear precisamente os diferentes componentes florestais da paisagem, a porcentagem de cobertura florestal foi considerada como sendo o somatório das categorias florestais ao nível de paisagem. Os componentes florestais são caracterizados por florestas maduras, florestas secundárias em estágios avançados de regeneração e plantações sombreadas de cacau, chamadas de cabruca.

Sendo assim, a partir de imagens de satélite Land Remote Sensing Satellite 5 (Landsat 5) e checagens de campo selecionaram-se 48 sítios agrupados em 4 classes de cobertura florestal. Uma circunferência com raio de 2000 m foi delimitada ao redor de cada sítio e quantificada a porcentagem de cobertura de cada um dos 48 sítios/paisagens.

No presente estudo, escolheu-se um sítio localizado em uma das classes, na qual a porcentagem de cobertura florestal na paisagem é de aproximadamente 70%.

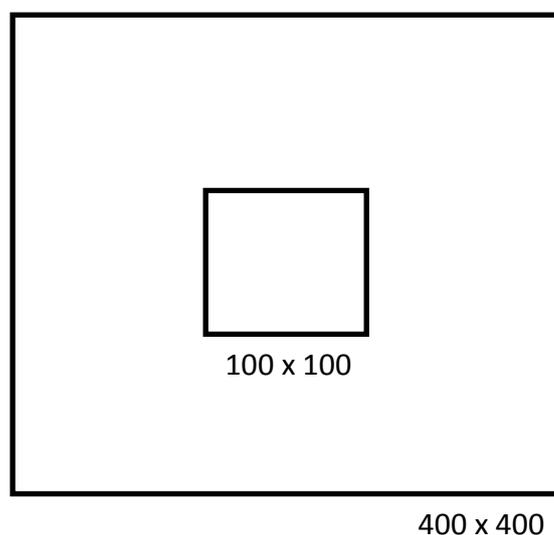
#### **4.2. População amostrada na RPPN Nova Angélica**

Uma parcela de 16 ha (400 x 400) (Figura 5) foi montada na RPPN Nova Angélica, baseada no desenho experimental de Tarazi *et al.*, (2013). Uma população natural de *M. maxima* T.D. Penn. foi escolhida para estudos genéticos, permitindo inferências precisas sobre o fluxo gênico contemporâneo e estrutura genética espacial. Foram amostrados indivíduos adultos (com CAP  $\geq 30$  cm) por toda a extensão da parcela e indivíduos jovens (com até aproximadamente 1,5m de altura) em uma parcela menor de 1 ha (100 x 100) localizada no centro da parcela de 16 ha (Figura 5).

Todos os indivíduos foram mapeados com auxílio de GPS (Sistema de Posicionamento Global) para identificação da localização espacial. Foi realizada também uma estimativa aproximada de altura das árvores adultas de

*M. maxima* T.D. Penn. e medida a circunferência à altura do peito (CAP) com fita métrica.

Amostras foliares de todos os indivíduos foram coletadas, ensacadas e encaminhadas ao Laboratório de Marcadores Moleculares (UESC) para a realização das análises genéticas.



**FIGURA 5:** Representação gráfica da parcela de 16 ha (400 x 400) com uma subparcela de 1 ha (100 x 100) de *M. maxima* na RPPN Nova Angélica, Una-BA.

#### **4.3. Extração de DNA genômico**

O DNA genômico de todos os indivíduos de *M. maxima* coletados foi extraído a partir de amostra foliar fresca de aproximadamente 300 mg, seguindo o método CTAB 2,0% (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Após a extração, quantificou-se o DNA das amostras por comparação com um padrão molecular conhecido (DNA  $\lambda$ ) em gel de agarose 0,8% corado com GelGreen™. Ambos foram submetidos à eletroforese em cuba horizontal contendo tampão TBE 1X, a 120 volts e 110 ampères, 100 watts durante 25 minutos. As “bandas” foram visualizadas no transluminador de luz de LED. Após essa etapa, o DNA das amostras foram diluídos a concentração de 2,5 ng /  $\mu$ l com água MiliQ.

#### **4.4. Transferibilidade de marcadores microssatélites**

A transferência de microssatélites foi testada a partir de *primers* desenvolvidos por Moraes (2012) para uma espécie do mesmo gênero, *M.*

*multifida*. Segundo Melo (2012) *M. multifida* é uma espécie filogeneticamente próxima da *M. maxima*.

#### 4.4.1 Condições de amplificação

A amplificação do DNA foi realizada a partir do coquetel (13 µl) composto por 7,5 ng de DNA, tampão para PCR 1X (10mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 8,5), 2,5 µg / ml de BSA, 250 µM de dNTPs, 0,2 µM de *primer*, 0,04 µM de primer marcado com fluorocromos específicos (6-FAM= azul, NED= amarelo ou HEX= verde) e 1U de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria). As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti® (Applied Biosystems) programado para o seguinte protocolo: 30 ciclos de 94° por 45 segundos, temperatura de hibridação específica de cada par de *primers* por 45 segundos (Tabela 1), 72° por 45 segundos; 10 ciclos de 94° por 1 minuto, 53° por 45 segundos, 72° por 45 segundos, terminando com 72° por 5 minutos.

**Tabela 1:** Características de seis primers de *Manilkara multifida* transferidos em *Manilkara maxima*, com amplitude alélica e temperatura de hibridação (T<sub>m</sub>).

<b>Locos</b>	<b>Amplitude alélica (pb)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>
<b>MM03</b>	182-236	59
<b>MM07</b>	162-206	56
<b>MM62</b>	256-316	56
<b>MM78</b>	170-236	59
<b>MM83</b>	262-372	58
<b>MM86</b>	174-242	53

Após essa etapa, os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5% corado com GelGreen<sup>TM</sup> e submetidos à eletroforese durante 25 minutos em cuba horizontal contendo tampão TBE 1X. Os fragmentos de DNA foram comparados com um marcador de peso molecular padrão (1 Kb DNA ladder - Invitrogen®) e visualizados em transiluminador de luz de LED, apenas para checagem de amplificação.

Os *primers* que resultaram em produtos de PCR positivos para o tamanho esperado no gel de agarose, foram submetidos a eletroforese em poliacrilamida (POP7) no Analisador Genético ABI 3500XL (Applied Biosystems). O comprimento dos alelos foram determinados através do tamanho padrão do GeneScan™ – 500 LIZ® com o auxílio do programa GeneMapper® (Applied Biosystems).

#### **4.4.2. Caracterização dos locos e genotipagem**

Dos oito locos microssatélites desenvolvidos originalmente para *M. multifida* por Moraes (2012), seis foram selecionados para testes de transferibilidade (Tabela 1) em 364 indivíduos de *M. maxima* (n= 281 adultos e n=83 jovens). Os locos microssatélites foram caracterizados quanto ao número de alelos por loco ( $A$ ), heterozigosidades observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ). Além disso, foram estimados também o conteúdo informativo de polimorfismo ( $PIC$ ); probabilidade de identidade genética ( $I$ ) (PAETKAU *et al.*, 1995), que corresponde a probabilidade de dois indivíduos aleatórios apresentarem o mesmo genótipo e a probabilidade de exclusão de paternidade ( $Q$ ) (WEIR., 1996), que indica a potência do conjunto de locos para análise de paternidade, pois é capaz de excluir um indivíduo de ser genitor de outro. Esses parâmetros foram realizados no programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI *et al.*, 2007).

### **4.5. Análise dos dados biológicos**

#### **4.5.1. Análise de parâmetros genéticos descritivos por geração**

Os parâmetros genéticos também foram analisados separadamente para os 281 indivíduos adultos e 83 jovens de *M. maxima* T.D. Penn. amostrados. São eles, número de alelos por loco ( $A$ ), número efetivo de alelos ( $\hat{A}_e=1/1$ -média da heterozigosidade esperada), heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) em equilíbrio de Hardy-Weinberg através do programa SPAGEDI 1.3 (HARDY & VEKEMANS, 2002). Com o auxílio do programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI *et al.*, 2007) realizou-se uma análise de identidade para verificar a presença de clones. O índice de fixação ( $F_{IS}= H_O-H_E/H_E$ ) foi utilizado para estimar a perda de heterozigotos na população devido ao cruzamento entre indivíduos aparentados, usando como referência a

frequência alélica da população adulta (HARDY *et al.*, 2004). A significância do  $F_{IS}$  foi confirmada a partir de 10.000 permutações sobre os locos utilizando a correção de Bonferroni no programa FSTAT (GOUDET, 1995). Observou-se também o número efetivo de indivíduos por geração a partir da fórmula ( $N_e = n / (1 + F_{IS})$ ), em que  $n$  representa o número de indivíduos por geração e  $F_{IS}$  o coeficiente de endogamia.

#### **4.5.2. Análise da distribuição e estrutura genética espacial**

A análise da distribuição espacial foi realizada a partir das coordenadas geográficas utilizando a função K proposta por Ripley (1976), a partir de 10.000 permutações no ambiente computacional “R”, através do pacote ads (PELISSIER & GOREAUD, 2013). A análise da estrutura genética espacial intrapopulacional foi realizada no programa SPAGEDI 1.3 (HARDY & VEKEMANS, 2002), a partir de estimativas dos coeficientes de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) para todos os pares de indivíduos propostas por Loiselle *et al.* (1995). Para obtenção de um intervalo de confiança de 95% de probabilidade, foram realizadas 10.000 permutações de genótipos entre nove classes de distância com tamanhos diferentes entre as gerações.

#### **4.5.3. Análise de fluxo gênico**

Seis locos microssatélites foram analisados no programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI *et al.*, 2007) para estimar o fluxo gênico contemporâneo. Para isso, uma análise de paternidade foi realizada em 81 indivíduos jovens amostrados na subparcela, sendo considerados como os possíveis pais candidatos os 281 indivíduos adultos da parcela maior. O método foi o de alocação categórica (SANCRISTOBAL & CHEVALET, 1997), pois não se conhecia previamente os supostos pais. Foram realizadas duas simulações. A primeira foi para alocar individualmente o genitor mais provável de sexo desconhecido, baseado no maior valor positivo do logaritmo da razão de probabilidade (o “LOD-score”) e na estatística Delta. A segunda foi para alocar os dois genitores mais prováveis, a partir de um sexo conhecido. Foram realizadas 100.000 repetições, considerando autofecundação durante a simulação e uma proporção de taxa de erro de genotipagem de 0,01 por loco, a

partir de 95% de pais candidatos amostrados. Quando os dois genitores mais prováveis tinham sido encontrados dentro da população, o genitor localizado mais próximo do jovem foi considerado como parental materno e o mais distante como parental paterno. E quando se encontrava apenas um genitor, este foi considerado como parental materno, baseado na metodologia de Dow & Ashley (1998) para espécies hermafroditas.

Em seguida, como todos os indivíduos jovens e adultos amostrados tinham sido genotipados e se conhecia a posição espacial utilizou-se o programa SPAGEDI 1.2 (HARDY & VEKEMANS, 2002) para verificar as distâncias espaciais entre os indivíduos jovens e os prováveis genitores. A distância espacial foi gerada pelo programa PAST (HAMMER *et al.*, 2001) determinando assim, as distâncias de fluxo gênico via sementes.

## 4.6. RESULTADOS

### 4.6.1. Caracterização dos microssatélites

A caracterização dos seis locos microssatélites transferidos para *M. maxima* revelou um total de 124 alelos distribuídos entre os 281 adultos e 83 jovens. Os locos MM 62 e MM 78 mostraram o maior número de alelos, 27 e 28 respectivamente, enquanto que o MM 07 apresentou apenas 13, representando o loco com o menor número de alelos (Tabela 2). O poder desses marcadores foi confirmado através da média do índice de polimorfismo ( $PIC= 0.746$ ), possibilitando inferir sobre parâmetros genéticos dentro da população. Observou-se que o valor médio de heterozigosidade observada ( $H_O$ ) foi menor que a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ). Em adição, a alta probabilidade de exclusão combinada dos locos ( $Q= 0.999948$ ) e a estimativa multiloco ( $I= 1.2 \times 10^{-7}$ ) (Tabela 2) indicam a confiabilidade desses marcadores para estimativas de paternidade e parentesco.

**Tabela 2:** Estimativas de variabilidade genética de *Manilkara maxima* em uma população (adultos e jovens) na RPPN Nova Angélica, BA a partir da transferência de seis locos microssatélites desenvolvidos para *M. multifida*.

Loco	A	PIC	$H_O$	$H_E$	I	Q
<b>Indivíduos= 364</b>						
<b>MM03</b>	17	0.831	0.734	0.831	0.049	0.152
<b>MM07</b>	13	0.736	0.818	0.760	0.082	0.225
<b>MM62</b>	27	0.848	0.781	0.862	0.032	0.104
<b>MM78</b>	28	0.778	0.464	0.797	0.059	0.165
<b>MM83</b>	17	0.772	0.832	0.796	0.065	0.190
<b>MM86</b>	22	0.511	0.520	0.537	0.240	0.462
<b>Total</b>	124	-	-	-	$1.2 \times 10^{-7*}$	0.999948*
<b>Média</b>	20.66	0.746	0.691	0.763	-	-

A= número de alelos; PIC= conteúdo informativo de polimorfismo;  $H_O$ = heterozigosidade observada;  $H_E$ = heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; I= análise de identidade e Q= índice de exclusão de paternidade. \*= probabilidade combinada

#### 4.6.2. Parâmetros genéticos por geração

Para os seis locos analisados, apesar do número de alelos ( $A$ ) ser diferente entre as duas gerações, o número médio efetivo de alelos ( $\hat{A}_E = 4.18$ ) foi igual, porém abaixo da metade de  $A$  (Tabela 3), indicando variação nas frequências alélicas dentro dos locos. A população apresentou uma redução significativa da heterozigosidade observada ( $H_O$ ) entre as gerações, com os adultos mostrando valores quase sempre maiores que os jovens (Tabela 3).

As duas gerações mostraram que valores médios de heterozigosidade observada ( $H_O$ ) foram menores do que a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), indicando déficit de indivíduos heterozigotos em alguns locos. Entretanto, apesar do número menor de jovens, a diversidade gênica está se mantendo, pois o valor médio da heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) foi igual nas duas gerações (Tabela 3). O índice de fixação ( $F_{IS}$ ) médio, baseado nas frequências gênicas, foi moderado nos adultos ( $F_{IS} = 0.078$ ) (Tabela 3), enquanto nos jovens, o valor médio foi mais alto ( $F_{IS} = 0.140$ ). Valores significativos de  $F$  (P-valor  $< 0.0083$ ) foram observados em apenas um loco (MM 78) nos adultos e em três (MM 03, MM 62 e MM 78) nos jovens amostrados, sugerindo ocorrência de endogamia nos jovens acarretando em excesso de homozigotos. Como consequência do número total de indivíduos e do índice de fixação ( $F_{IS}$ ), os tamanhos efetivos dos indivíduos adultos e jovens foram respectivamente (260 e 72).

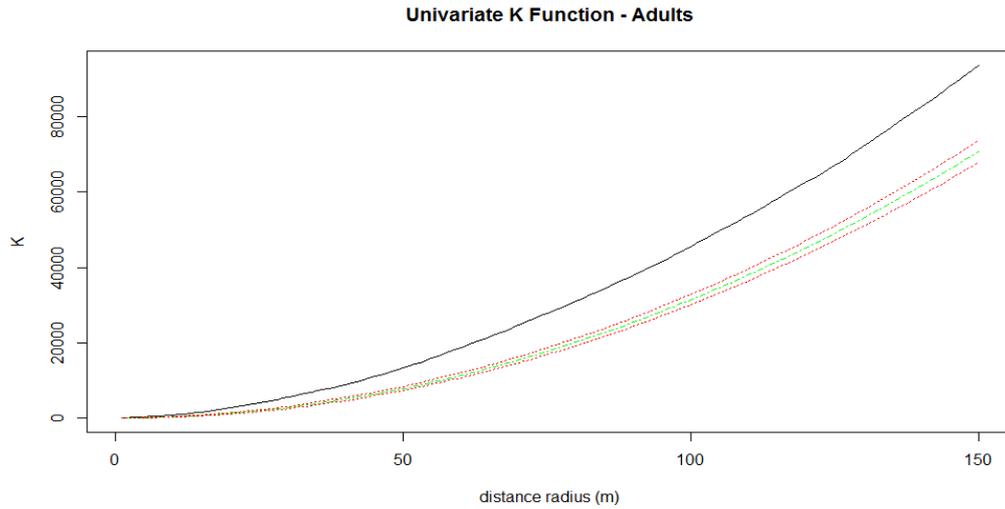
**Tabela 3:** Estimativas de variabilidade genética em adultos e jovens de *Manilkara maxima* em uma população na RPPN Nova Angélica, BA.

<b>Loco</b>	<b>A</b>	<b><math>\hat{A}_E</math></b>	<b><math>H_O</math></b>	<b><math>H_E</math></b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b>AN</b>
<b>Adultos= 281</b>						
<b>MM 03</b>	17	-	0.764	0.817	0.065	+0.033
<b>MM 07</b>	13	-	0.821	0.762	-0.078	-0.041
<b>MM 62</b>	26	-	0.820	0.863	0.049	+0.022
<b>MM 78</b>	27	-	0.467	0.826	0.435	+0.277
<b>MM 83</b>	15	-	0.821	0.786	-0.045	-0.026
<b>MM86</b>	13	-	0.521	0.514	-0.009	+0.015
<b>Média</b>	18.5	4.18	0.702	0.761	0.078	-
<b>Jovens= 83</b>						
<b>MM 03</b>	11	-	0.630	0.852	0.275	+0.146
<b>MM 07</b>	9	-	0.807	0.757	-0.066	-0.040
<b>MM 62</b>	19	-	0.650	0.863	0.247	+0.133
<b>MM 78</b>	15	-	0.455	0.681	0.333	+0.200
<b>MM 83</b>	13	-	0.872	0.812	-0.074	-0.040
<b>MM 86</b>	18	-	0.518	0.603	0.141	+0.091
<b>Média</b>	14.1	4.18	0.655	0.761	0.140	-

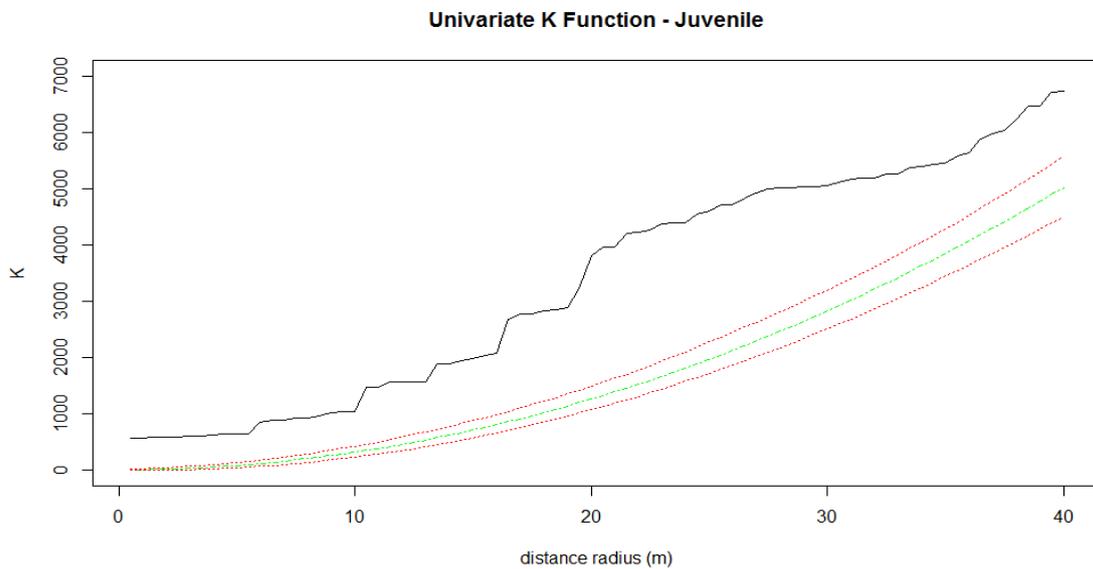
A= número de alelos;  $\hat{A}_E$ = número médio efetivo de alelos;  $H_O$ = heterozigosidade observada;  $H_E$ = heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg;  $F_{IS}$ = índice de fixação e AN= alelos nulos.

#### 4.6.3. Distribuição e estrutura genética espacial

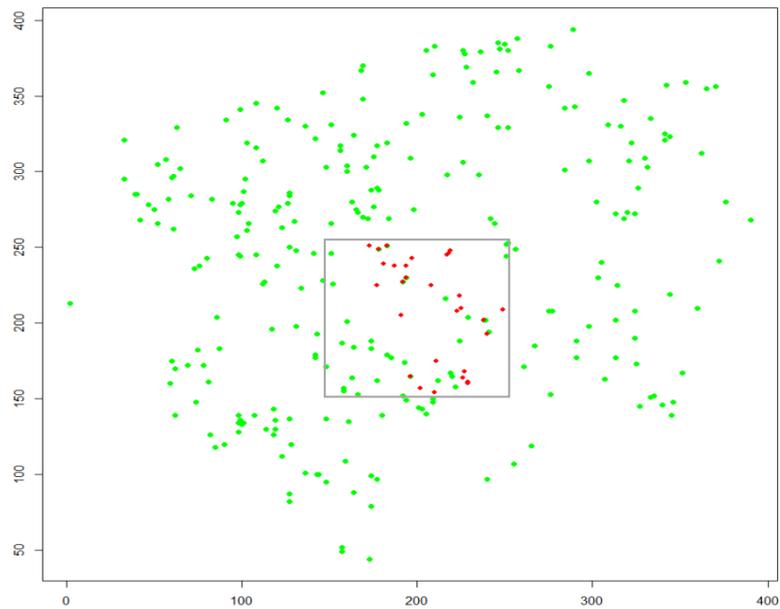
Os 281 indivíduos adultos (CAP  $\geq$  30 cm) amostrados na RPPN Nova Angélica apresentaram densidade populacional de 17,5 indivíduos/ha na parcela de 16 ha (400 x 400) e de acordo com a função K univariada, uma distribuição uniforme (Figura 6). Em adição, os 83 indivíduos jovens (com até aproximadamente 1,5 m de altura) apresentaram densidade populacional de 83 indivíduos/ha e uma distribuição uniforme (Figura 7) na subparcela de 1 ha (100 x 100) localizada no centro da parcela de 16 ha (Figura 8). Por outro lado, a função K bivariada utilizada para avaliar a associação entre adultos e jovens revelou um padrão aleatório (Figura 9).



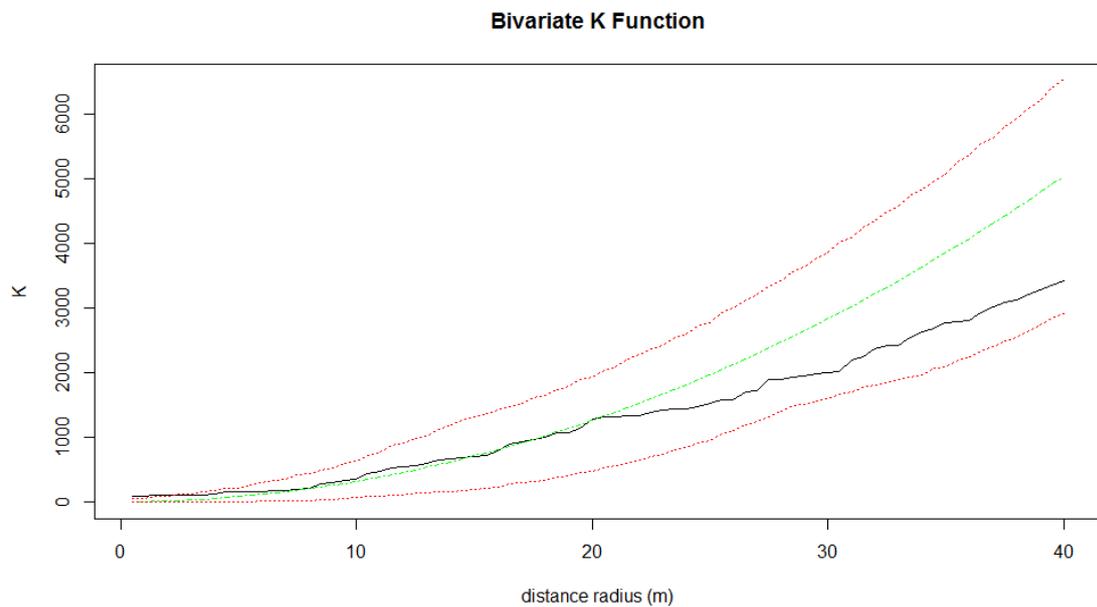
**Figura 6:** Gráfico da função univariada para os 281 adultos de *Manilkara maxima* na parcela de 16 ha na RPPN Nova Angélica, Una-BA. A linha preta contínua indica a distribuição espacial dos jovens. A linha verde indica a média esperada ao acaso caso a distribuição dos indivíduos fosse totalmente randômica e as linhas em vermelho representam os limites superior e inferior das permutações (representando os limites do esperado ao acaso nas 10000 randomizações)



**Figura 7:** Gráfico da função univariada para os 83 jovens de *Manilkara maxima* na subparcela de 1 ha na RPPN Nova Angélica, Una-BA. A linha preta contínua indica a distribuição espacial dos jovens. A linha verde indica a média esperada ao acaso caso a distribuição dos indivíduos fosse totalmente randômica e as linhas em vermelho representam os limites superior e inferior das permutações (representando os limites do esperado ao acaso nas 10000 randomizações)

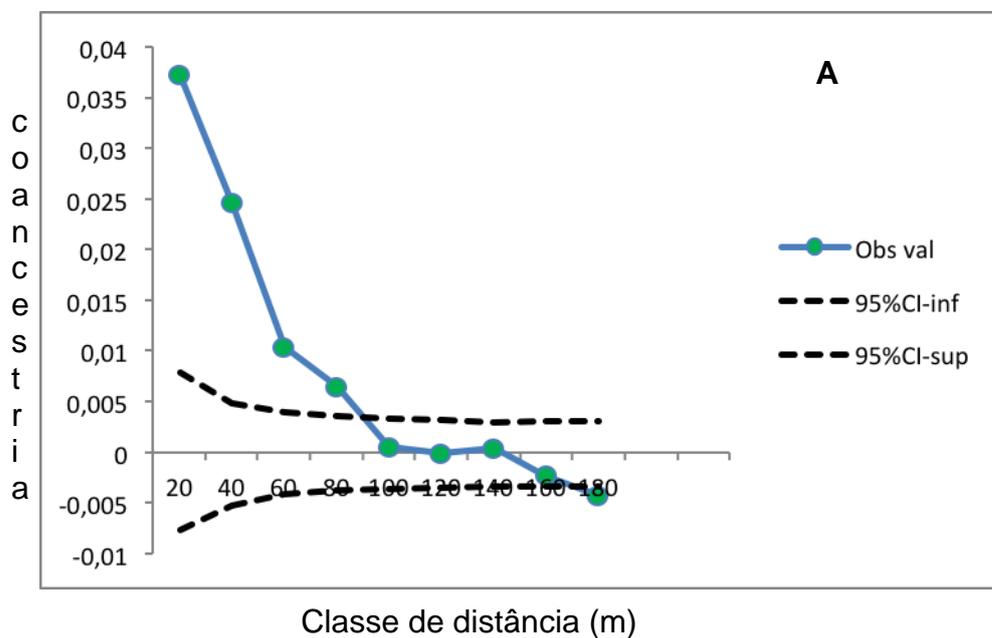


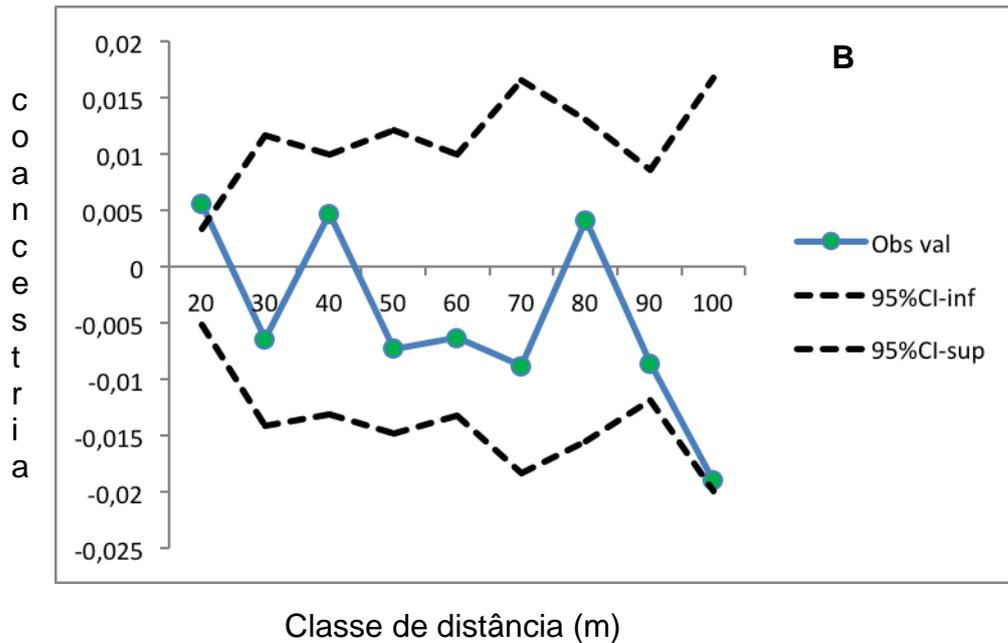
**Figura 8:** Representação gráfica da distribuição espacial de indivíduos adultos (em verde) na parcela 400 x 400 e jovens (em vermelho) no centro da parcela de 100 x 100 de *M. maxima* na RPPN Nova Angélica, Una-BA



**Figura 9:** Gráfico da função bivariada para os indivíduos adultos e jovens de *Manilkara maxima* na subparcela de 1 ha na RPPN Nova Angélica, Una-BA. A linha preta contínua indica a distribuição espacial dos adultos e jovens. A linha verde indica a média esperada ao acaso caso a distribuição dos indivíduos fosse totalmente randômica e as linhas em vermelho representam os limites superior e inferior das permutações (representando os limites do esperado ao acaso nas 10000 randomizações)

Considerando o intervalo de confiança de 95%, a análise da estrutura genética espacial intrapopulacional revelou, a partir de estimativas do coeficiente de coancestria entre os pares de árvores, valores significativamente diferentes entre as gerações. Os indivíduos adultos encontram-se estruturados geneticamente até uma distância de aproximadamente 90 metros (Figura 10 A), com uma diminuição contínua em distâncias maiores e um coeficiente de coancestralidade de 0,069. Por outro lado, os indivíduos jovens apresentaram-se estruturados até 20 metros de distância e um coeficiente de coancestralidade de 0,151 (Figura 10 B).





**Figura 10:** Análise da estrutura genética espacial em indivíduos adultos (A) e jovens (B) em uma população natural de *M. maxima*, na RPPN Nova Angélica, Una-BA. A linha contínua indica o coeficiente médio de parentesco e as pontilhadas representam os limites superior e inferior do intervalo de confiança de 95% a partir de 10000 permutações

#### 4.6.4. Paternidade

Com base na exclusão de probabilidade dos seis locos microssatélites altamente polimórficos e com um nível de confiança de 95%, para 72 (88,88%) dos 81 jovens analisados de *M. maxima*, foi encontrado pelo menos um provável genitor e para 10 (12,34%), foram encontrados dois prováveis genitores entre os 281 adultos localizados na parcela de 16 ha (Figura 11). Desses 10 jovens e seus prováveis genitores (Tabela 4), 1 jovem (1,23%) identificado como (J 66) foi gerado por autofecundação do adulto identificado como (A 213). Observou-se também que dois adultos identificados como (A 213 e A 221) foram os que obtiveram maior sucesso reprodutivo, cada um apresentando alta probabilidade de ser um dos genitores de 3 (1,06%) dos jovens amostrados.

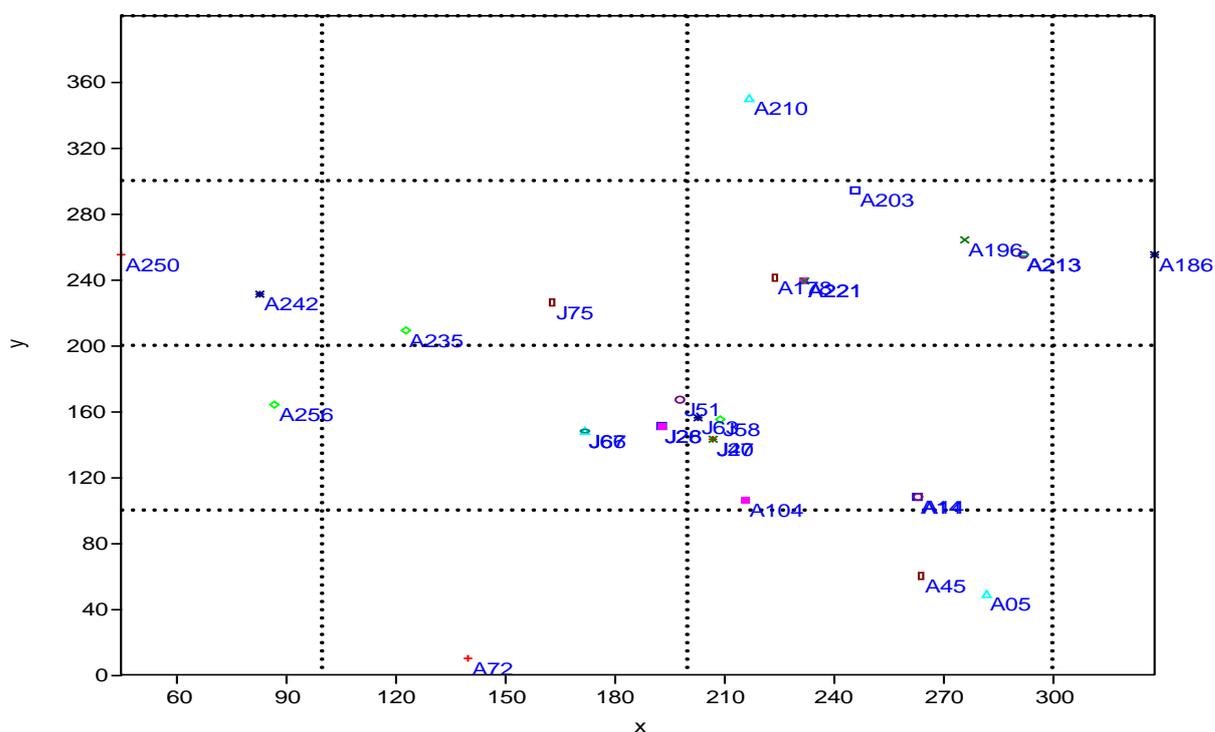
**Tabela 4:** Análise de paternidade de *Manilkara maxima*. Delta e “LOD–score” com nível de confiança de 95%.

<b>Jovem</b>	<b>genitor atribuído</b>	<b>Locos</b>	<b>LOD score</b>	<b>genitor atribuído</b>	<b>Locos</b>	<b>LOD score</b>	<b>Delta</b>
J 20	A 072	4	4.16E+00	A 250	4	3.84E+00	2.45E+00
J 26	A 203	4	5.04E+00	A 014	5	2.89E+00	3.92E-01
J 28	A 104	4	5.49E+00	A 221	4	3.16E+00	3.13E+00
J 47	A 196	6	7.54E+00	A 221	5	3.55E+00	4.65E+00
J 51	A 014	5	8.77E+00	A 213	5	3.24E+00	3.43E+00
J 58	A 256	6	5.81E+00	A 235	4	3.30E+00	4.51E+00
J 63	A 242	5	3.00E+00	A 186	5	2.10E+00	2.65E+00
J 66	A 213	5	5.82E+00	A 213	5	5.82E+00	3.86E+00
J 67	A 210	6	3.31E+00	A 005	5	2.21E+00	2.89E+00
J 75	A 178	4	3.87E+00	A 045	3	2.95E+00	3.47E+00

Com base nos 10 jovens que tiveram os dois genitores atribuídos encontrados dentro da parcela de 16 ha, a distância de polinização variou de 50,60 m a 307,94 m, com média de 175,67 m (Tabela 5), enquanto que para a distância de dispersão a variação foi de 50,52 m a 160,77 m e média de 108.32 m (Tabela 5).

**Tabela 5:** Distância de fluxo gênico via pólen e sementes de *Manilkara maxima* na RPPN Nova Angélica, Una-BA.

Adulto “mãe”	Adulto “pai”	Distância de polinização (m)	Adulto “mãe”	Jovem	Distância de dispersão (m)
A 072	A 250	262.77	A 072	J 20	148.93
A 014	A 203	186.78	A 014	J 26	082.16
A 104	A 221	133.96	A 104	J 28	050.52
A 221	A 196	050.60	A 221	J 47	099.17
A 014	A 213	149.83	A 014	J 51	087.78
A 235	A 256	057.62	A 235	J 58	101.59
A 242	A 186	246.17	A 242	J 63	141.51
A 213	A 213	-	A 213	J 66	160.77
A 005	A 210	307.94	A 005	J 67	147.97
A 178	A 045	185.37	A 178	J 75	062.81
<b>Média</b>	-	175,67	-	-	108.32



**Figura 11:** Representação gráfica da análise de paternidade de 10 indivíduos jovens de *M. maxima* na parcela de 16 ha na RPPN Nova Angélica, Una-BA. As cores representam as famílias (“pai”, “mãe” e filho), sendo os adultos iniciados com a letra (A) e os jovens com a letra (J). A localização entre os jovens (J66 e J 67) são próximas, assim como para (J 26 e J 28) e (J 47 e J 20).

## 4.7. DISCUSSÃO

Apesar das formações florestais da Mata Atlântica no sul da Bahia serem representadas por um mosaico de florestas em diferentes estágios de sucessão, ainda abrigam remanescentes nativos conservados (PARDINI *et al.*, 2009). As análises genéticas realizadas neste trabalho a partir de locos microssatélites evidenciaram a predominância de uma população natural de *M. maxima* com elevada variabilidade genética e baixa estrutura genética espacial. Esta observação sugere que essa população possibilitará estudos genéticos comparativos com outras populações em diferentes categorias de florestas devido a sua capacidade de resposta ao nível de paisagem com grande porcentagem de cobertura florestal. Contribuindo assim, para estudos sobre o movimento de genes a longas distâncias pelo fato da espécie participar de interações mutualísticas com agentes de polinização e dispersão não especializados, além de ser uma arbórea endêmica e ameaçada de extinção em remanescentes de Mata Atlântica no sul da Bahia.

### 4.7.1. Transferibilidade de microssatélites

Em estudos genéticos, a transferência de *primers* microssatélites é uma alternativa no trabalho com marcadores microssatélites na tentativa de minimizar os custos. Isto é possível devido à homologia entre as regiões flanqueadoras dos microssatélites na molécula de DNA (MORGANTE & OLIVIERI, 1993; COLLEVATTI *et al.*, 1999). Neste trabalho, o sucesso da amplificação heteróloga foi devido ao estreito relacionamento entre as espécies (MELO, 2012). Em geral, as análises genéticas realizadas com marcadores microssatélites transferidos detectam altas taxas de transferência entre espécies do mesmo gênero, enquanto que, quando a divergência genética entre eles aumenta o sucesso de amplificação diminui (BARBARÁ *et al.*, 2007).

As análises revelaram um alto polimorfismo (*PIC*) dos locos analisados e a presença de vários alelos, com uma média de 20,66 alelos/loco. Acredita-se que o número médio de alelos elevado seja devido à proximidade evolutiva de *M. maxima* com *M. multifida* (MELO, 2012) e à quantidade elevada de indivíduos utilizados na caracterização, com uma diferença representativa entre a quantidade de alelos nos jovens e adultos por loco. Em geral, o número médio de alelos encontrados nos trabalhos de transferência de microssatélites

é em torno de 10 alelos/loco. (NYBOM, 2004). O alto polimorfismo dos locos é uma das características dos microssatélites nucleares (MARTINS, 2005), possibilitando estudos genéticos populacionais com estimativas confiáveis.

#### **4.7.2. Parâmetros genéticos entre as gerações**

Neste trabalho, a modificação do habitat na região de Una-BA devido à ação antrópica, parece não ter gerado gargalo genético ou restrições da variabilidade genética da população de *M. maxima* na área amostrada. As diferenças observadas nos parâmetros genéticos analisados entre as gerações de *M. maxima* estão relacionadas ao maior número de alelos exclusivos dos indivíduos adultos (31,45%) em comparação com os alelos exclusivos dos jovens (11,29%). Supõe-se que nos jovens, os alelos exclusivos de adultos tenham sido perdidos por deriva genética durante a reprodução e recrutamento ou que nem todos os adultos amostrados estão se reproduzindo. Em adição, os alelos exclusivos dos jovens poderiam ter surgidos por mutação durante a replicação do DNA. Porém, a análise de mutação não foi realizada neste trabalho. Uma outra hipótese seria a de os alelos exclusivos terem sido trazidos por migração através de agentes polinizadores de fora da parcela de amostragem, pois o desenho amostral permitiu inferir a variabilidade presente na maioria dos adultos localizados ao redor dos jovens.

Em adição, uma presença maior de genótipos homozigotos nos indivíduos jovens foi observada em comparação com os adultos. Um número maior de homozigotos nos jovens pode ser devido ao cruzamento entre parentes, autofecundação ou frequência elevada de alelos nulos nos locos microssatélites (ALDRICH *et al.*, 1998). Alelos nulos podem ser resultados da não amplificação de um alelo durante a PCR (MARTINS *et al.*, 2008), levando a um falso homozigoto. Este fenômeno é relativamente comum quando se faz transferência de *primers* microssatélites entre espécies próximas. Acredita-se que nesta população uma maior presença de alelos nulos nos jovens esteja favorecendo a frequência elevada de homozigotos quando comparada a baixa frequência de homozigotos e endogamia encontrada nos adultos (ALDRICH *et al.*, 1998). Nos jovens, observou-se que locos com alelos nulos (MM 03, MM 62, MM 78 e MM 86) apresentaram uma frequência de genótipos heterozigotos menores em relação às proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-

Weinberg. Essa estimativa foi observada também nos adultos para o loco MM 78. A presença menor de heterozigotos nos jovens pode ser explicada provavelmente porque os jovens amostrados com maior frequência de homozigotos podem estar em maior quantidade no momento, entretanto, durante a fase de crescimento da planta, processos regulatórios irão favorecer ou limitar sua presença na área, possibilitando chegar até a fase adulta.

Em adultos, a média dos valores do índice de fixação ( $F_{IS}$ ) foi relativamente baixa, com alguns locos significativamente negativos, indicando excesso de heterozigotos, muito comum na fase adulta de espécies arbóreas (BUSH & SMOUSE, 1992). Entretanto, estimativas elevadas de  $F_{IS}$  devem ser interpretadas com cautela, pois índices de fixação significativamente positivos e diferentes de zero, podem ser devido a diversas causas. Devido a estimativa do  $F_{IS}$  demonstrar uma endogamia baixa na fase adulta, acredita-se que nessa população ocorra uma seleção a favor de indivíduos heterozigotos. A seleção contra genótipos homozigotos pode acontecer durante todas as fases de crescimento da planta, filtrando genótipos homozigotos provavelmente por mecanismos de auto-incompatibilidade contra a autofecundação (BARRET, 2003), predação por fungos, dentre outros.

A presença elevada de indivíduos heterozigotos entre os adultos de *M. maxima* amostrados contribuiu positivamente para um elevado tamanho efetivo. Evidenciando, nessa população, indivíduos com grande representatividade genética e grande potencial para conservação genética *in situ*. Além disso, esses indivíduos também são ideais para conservação genética *ex situ*, através de programas de restauração florestal utilizando coleta de sementes com elevada variabilidade genética.

A alta diversidade de *M. maxima* pode estar relacionada alta capacidade de respostas às mudanças ambientais e à síndrome de polinização não especializada. *M. maxima* provavelmente pode ser polinizada por abelhas, morcegos e aves (PENNINGTON, 2004; AZEVEDO *et al*, 2007; RABOY *et al.*, 2008), os quais podem contribuir para uma migração de pólen nos diferentes locais com diferentes distâncias. Neste trabalho pode-se observar que distâncias diretas de polinização variaram de 50,60 m a 307,94 m. Outras características que provavelmente estejam contribuindo para a alta diversidade são: múltiplos agentes de dispersão de sementes como morcegos, pássaros e

primatas e à alta densidade populacional desta espécie no local de amostragem (Figura 8) e em áreas vizinhas protegidas ou de particulares. Ganzhorn (2010), em pesquisa realizada com esta espécie em outra RPPN também verificou alta densidade de adultos nas localidades de Una-BA. A alta densidade populacional é vantajosa por minimizar os efeitos genéticos negativos e favorecer o fluxo de genes intrapopulacional. Em contrapartida, a alta densidade de indivíduos também pode induzir mortalidade dependente de densidade devido à competição por recursos.

#### **4.7.3. Distribuição e estrutura genética espacial**

Na população de *M. maxima* estudada detectou-se baixa estrutura genética espacial nas duas gerações. No entanto, a extensão e a distância de parentesco foram diferentes entre as classes amostradas. A estrutura genética espacial apresentada pelos adultos, nas quatro primeiras classes de distância, foi moderada e o valor se aproximou de uma taxa média de parentesco relacionada para primos de primeiro grau ( $\theta_{xy} = 0,0625$ ). Essa estrutura genética observada se aproxima do padrão real de coancestria que ocorre em populações arbóreas com até 50 m de distância (MARTINS, 2005).

Os padrões espaciais observados em vegetais são reflexos do movimento de forrageamento dos dispersores (JORDANO & GODOY, 2002), pelo fato dos agentes de dispersão serem responsáveis pelo transporte das sementes para locais propícios ao estabelecimento de novas plantas. Portanto, para a população de *M. maxima* amostrada na RPPN Nova Angélica, supõe-se que a estrutura genética espacial encontrada nos adultos pode ser devido à heterogeneidade espacial no passado e devido à distribuição espacial uniforme da espécie, na qual os indivíduos encontram-se a distâncias semelhantes uns dos outros. Os adultos estavam presentes em toda extensão da parcela amostrada, verificando a partir de observação pessoal e por análise estatística, uma distribuição espacial mais uniforme do que ao acaso. Essa distribuição segundo Legendre & Fortin (1989) é rara para populações de plantas.

Como a dispersão de sementes influencia a distribuição dos indivíduos, acredita-se que nesta população os dispersores de *M. maxima* no passado, provavelmente pássaros, morcegos ou primatas foram eficientes. Assim como os pássaros, segundo Guevara & Labore (1993) morcegos também costumam

voar por trilhas naturais até poleiros de alimentação, e dessa forma, as sementes são dispersadas pelo caminho e a longas distâncias. Esse tipo de dispersão possivelmente influencia a não-agregação nos poleiros de alimentação e favorece a abundância de indivíduos na área.

Por outro lado, os indivíduos jovens apresentaram alguma estrutura genética espacial somente na primeira classe de distância, revelando que indivíduos próximos com uma distância de até 20 m são mais prováveis de serem relacionados. Neste trabalho, *M. maxima* apresentou uma taxa média de parentesco para a primeira classe próxima a de meios-irmãos ( $\theta_{xy}=0,125$ ). A comprovação deste dado foi observada a partir da análise de paternidade, realizada neste trabalho. Para dois indivíduos jovens identificados como (J 28 e J 47), verificou-se tratar-se de meio-irmãos já que apenas um adulto foi atribuído como genitor destes jovens. A distância apresentada entre eles foi de 16 m.

A partir da segunda classe, acima dos 20 m, os jovens encontram-se mais distantes geneticamente. Esse tipo de distribuição dos jovens pode ser devido à abundância de sementes (MCKEY, 1975) na área. Segundo Pessoa *et al.*, (2011) a frutificação de *M. maxima* é anual e estendida durante todos os meses do ano. Sendo assim, o estabelecimento das sementes vai depender das interações posteriores com os agentes de dispersão. Em adição, considerando o padrão aleatório da associação espacial entre adultos e jovens, supõe-se que não está havendo o estabelecimento de jovens nem muito próximos e nem tão distantes à planta-adulta.

Acredita-se que a diferença entre a estrutura genética espacial entre as gerações seja devido ao agente dispersor. No passado, eles ocorriam em grande quantidade e com maior disponibilidade de habitat, proporcionando deposição de sementes em vários locais. Possivelmente, por este motivo a EGE encontrada nos adultos seja compatível com outras espécies vegetais já estudadas em ambientes conservados (MARTINS, 2005). Entretanto, provavelmente devido à fragmentação, o habitat tenha ficado restrito aos remanescentes florestais, para muitos destes dispersores. A ocupação dos remanescentes florestais com os animais do entorno teria aumentado a população de dispersores e, conseqüentemente melhorado a eficiência de dispersão num primeiro momento. Este cenário, pós-fragmentação recente,

pode estar refletido na menor EGE dos jovens em relação aos adultos, com menor parentesco (coancestria) observado entre jovens (indicando maior eficiência de polinização/dispersão nesta geração) quando comparado à EGE dos adultos.

Portanto, sugere-se que a dispersão contemporânea de sementes está sendo eficiente dentro da parcela, contribuindo conseqüentemente para uma baixa estrutura espacial nas gerações desta população. Estes resultados evidenciam que a paisagem circundante esteja favorecendo o movimento de genes e a manutenção da alta diversidade genética na área amostrada.

#### **4.7.4. Fluxo gênico e análise de paternidade**

O fluxo de genes via pólen e sementes é um dos processos-chaves para entender os efeitos gerados pela ação antrópica no ambiente. Neste trabalho, o sucesso das análises de paternidade foi devido ao tipo de marcador, quantidade de indivíduos adultos de *M. maxima* amostrados, além do delineamento experimental e da inexistência de genótipos idênticos entre eles.

A partir da identificação dos genitores de 88,88% dos jovens, constatou-se o movimento de genes entre os indivíduos dessa população. Esse resultado foi possível também, devido à presença ativa de polinizadores e dispersores na área de estudo, constatados por observação pessoal e em outros estudos. Pessoa (2008) verificou a presença de aves e primatas em indivíduos adultos de *M. maxima* durante estudos de Fenologia em áreas próximas.

Para os 10 jovens em que os dois prováveis pais foram identificados, observou-se que a reprodução de *M. maxima* na área amostrada ocorre mais frequentemente por cruzamento aleatório, porque nas análises apenas 1 jovem foi gerado por autofecundação. Para os jovens em que apenas um genitor foi encontrado, a medida de fluxo foi baseada na dispersão de sementes, atingindo o maior valor de dispersão de sementes de 160,77 m. Certamente, quando se considera a paisagem, a distância de dispersão deve ser maior. Os valores de distância de dispersão encontrados neste trabalho são restritos à área máxima de amostragem.

Com base no teste de paternidade realizado e as distâncias observadas entre os genitores, acredita-se que a dispersão de pólen de *M. maxima* na área, em sua maioria, acontece a longas distâncias. As análises também

evidenciaram uma imigração de pólen de cerca de 87,6%, o que indica que para os jovens que não foram encontrados nenhuma paternidade, provavelmente os genitores não foram amostrados e estejam localizados fora da parcela de amostragem, sugerindo nesse caso, distâncias maiores que 400 metros.

Outro fato interessante é que parece que *M. maxima* não realiza seleção contra pólen de vizinhos próximos, pois se constatou distâncias de polinização de 50,52 m.

Valores consideráveis de fluxo gênico da arbórea *M. maxima* foram observados na RPPN Nova Angélica, indicando que interações ecológicas estejam ocorrendo na área, as quais contribuem para a manutenção da diversidade genética dentro da população.

#### 4.8. CONCLUSÕES

1) Os 6 locos microssatélites foram transferidos com sucesso de *M. multifida* para *M. maxima*, mostrando-se altamente informativos na obtenção de parâmetros genéticos;

2) A população de *M. maxima* apresentou alta densidade de indivíduos com elevada variabilidade genética e baixa endogamia entre os adultos;

3) A população de *M. maxima* apresentou moderada estrutura genética espacial entre os adultos e baixa estrutura genética espacial nos jovens, indicando que os indivíduos estão distribuídos ao longo da área com pouca relação de parentesco mesmo entre indivíduos próximos fisicamente;

4) A análise de paternidade realizada dentro da população natural mostrou que o fluxo gênico pode ocorrer a longas distâncias devido a presença de agentes polinizadores e dispersores ativos de *M. maxima* no local de amostragem e áreas vizinhas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W.T.; BIRKES, D.S. 1991. Estimating mating patterns in forest tree populations. In: FINESCHI, S.; MALVOTI, E.M.; CANNATA, F.; HATTEMER, H.H.(eds.). **Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees** SPB Academic Publishing, p.152–172.

ALDRICH, P.R.; HAMRICH, J.L. 1998. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. **Science**, v.281, p.103-105.

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

ALGER, K.; CALDAS, M. 1996. Cacau na Bahia: decadência e ameaça à Mata Atlântica. **Ciência Hoje**. V.20, n.117, p.28 - 35.

ALGER, K.; ARAÚJO, M. 1996. Desmatamento dos últimos remanescentes florestais próximos à reserva biológica de Una: uma ameaça à biodiversidade e à economia local. In: **Alternativas para conservação e desenvolvimento na região de Una, Bahia**. – resumos de pesquisa 1994-1995. Instituto de Estudos Sócio-Ambientais do Sul da Bahia – IESB. BA, 23p.

ALMEIDA Jr., E.B. **Diversidade de Manilkara Adans. (Sapotaceae) para o Nordeste do Brasil**. 2010. 157p. Tese de (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.

ALMEIDA Jr., E.B. 2013. *Manilkara* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14479>)

AMORIM, A.M.; JARDIM, J.G.; LOPES, M.M.M.; FIASCHI, P.; BORGES, R.A.X.; PERDIZ, R.O.; THOMA, W.W. 2009. Angiospermas em remanescentes

de floresta montana no sul da Bahia, Brasil. **Biota Neotropica**, v.9, n.3, p.313-348.

AUSTERLITZ, F.; DICK, C.W.; DUTECH, C.; KLEIN, E.K.; ODDOUMURATORIO, S.; SMOUSE, P.E.; SORK, V.L. 2004. Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. **Molecular Ecology**, Oxford, v.13, p.937-954.

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

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v.16, p.3759–3767.

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, p.991-1004.

BARRETT, S.C.H.; KOHN, J.R., 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population sizes in plants: implications for conservation. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (eds.). **Genetics and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, p.3-30.

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

BUSH, R.M., SMOUSE, P.E. 1992. Evidence for the adaptive significance of allozymes in forest trees. **New Forests**, v.6, p.176–196.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S., 2006. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, 374p.

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

CAVALLARI, M.M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium (Bromeliaceae)* e implicações para sua conservação**. 2004. 92p. Dissertação de (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, SP.

CAVERS, S.; DEGEN, B.; CARON, H.; LEMES, M.R.; MARGIS, R.; SALGUEIRO, F.; LOWE, A.J. 2005. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. **Heredity**, v.95, p.281–289.

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

CHASE, M.R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. 1996. Distant gene flow in tropical trees. **Nature**, v.383, p.398-399.

COCKERHAM, C.C. 1969. Variance of gene frequency. **Evolution**, Lancaster, v.23, p.72-84.

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v.83, p.748-756.

CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, v.34, p.66-71.

COIMBRA-FILHO, A.F.; CÂMARA, I. G., 1996. Os limites originais do bioma Mata atlântica na região do Nordeste Brasileiro. Rio de Janeiro. Fundação Brasileira para Conservação da Natureza (FBCN), 86p.

DEAN, W. 1997. A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira. **Companhia das Letras**, São Paulo, SP, 1ª reedição, 484 p.

DEVLIN, B.; ELLSTRAND, N.C. 1990. The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. **Evolution**, v.44, p.258–259.

DIAS, L.A.S. 2001. **Melhoramento genético do cacaueteiro**. Viçosa: Funape, 578p.

DICK, C.W.; BERMINGHAM, E.; LEMES, M.R.; GRIBEL, R. 2007. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. **Molecular Ecology**, v.16, p.3039-3049.

DOW, B.D.; ASHLEY, M.V. 1998. High levels of gene flow in Bur Oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Journal of Heredity**, v.89, p.62–70.

ENNOS, R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, v.72, p.250–259.

EPPERSON, B.K.; ALLARD, R.W. 1989. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. **Genetics** v.121, p.369–377.

EPPERSON, B.K. 2003. Geographical genetics. **Princeton University Press**, Princeton, 376p.

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

FARIA, D.M. **Comunidade de morcegos em uma paisagem fragmentada da Mata Atlântica do sul da Bahia**. 2002. 134p. Tese de (Doutorado em Ecologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

FARIA, D.; PACIENCIA, M.L.B.; DIXO, M.; LAPS, R.R.; BAUMGARTEN, J. 2007. Ferns, frogs, lizards, birds and bats in forest fragments and shade cacao plantations in two contrasting landscapes in the Atlantic forest, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v16, p.2335–2357.

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, p.2226-2234.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1995. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 220p.

FRAGOSO, J.M.V.; SILVIUS, K.M.; CORREA, J.A. 2003. Long-distance seed dispersal by tapirs increases seed survival and aggregates tropical trees. **Ecology**, v.84, p.1998-2006.

GALETTI, M. 2001. Indians within conservation units: lessons from the Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v.15, p.798–799.

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. p.03-11.

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.

GANZHORN, S. 2010. Genetic diversity of *Manilkara maxima* an ecologically important tree species. **Fordhan University**, NY. 2p.

GARCÍA, C.; JORDANO, P.; GODOY, J.A. 2007. Contemporary pollen and seed dispersal in a *Prunus mahaleb* population: patterns in distance and direction. **Molecular Ecology**, v.16, p.1947-1955.

GASCON, C.; WILLIAMSON, G.B.; da FONSECA, G.A.B. 2000. Ecology—receding forest edges and vanishing reserves. **Science**, v.288, p.1356–1358.

GEPTS, P.1993. The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. **Evolution Biology**, v.27, p.51-94.

GOUDET, J. 1995. Fstat: a computer program to calculate *F*-statistics. **Journal of Heredity**, v.86, p.485-486. Version 2.9.3.2.

GOUVÊA, J.B.S. 1969. Contribuição à geomorfologia do Sul da Bahia. Área dos baixos cursos dos rios Pardo e Jequitinhonha. **Comunicação Técnica 35**. CEPEC/CEPLAC, Itabuna, BA, 11 p.

GUEVARA, S.; LABORDE, J. 1993. Monitoring seed dispersal at isolated standing trees in tropical pastures: consequences for local species availability. **Vegetatio**, v.107, p.319-338.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. 2001. PAST - Paleontological Statistics software package for education and analysis. **Palaeontologia Electronica** 4 (1) 9p.

HAMRICK, J.L.1982. Plant population genetic and evolution. **American Journal of Botany**, v.69, n.10, p.1685-1693.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. 1997. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. In: SILVERTOWN, J.; FRANCO, M.; HARPER, J.L.

(eds.). **Plant life histories. Ecology, phylogeny and evolution**, Cambridge University Press, Cambridge. UK, p.102-118.

HAMRICK, J.L.; NASON, J.D. 1996., Consequences of dispersal in plants. In: RODHES, O.E.J.; CHESSER, R.K.; SMITH, M.H. (eds.). **Population dynamics in ecological space and time**. Chicago, IL: University of Chicago Press. p.203-236.

HAMRICK, J.L.; SCHNABEL, A. 1985. Understanding the genetic structure of plant populations: some old problems and a new approach. **Population genetics in Forestry**, v.60, p.50-70.

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

HARDY, O.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; COLAS, B.; FRÉVILLE, H.; MIGNOT, A.; OLIVERI, I. 2004. Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). II. Correlated paternity within and among sibships. **Genetics**, Austin, v.168, p.1601-1614.

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

HUSBAND, B.C.; BARRETT, S.C.H. 1996. A metapopulation perspective in plant population biology. **Journal of Ecology**. v.84, p.461–469

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

JORDANO P.; GODOY J.A. 2002. Frugivore-generated seed shadows: a landscape view of demographic and genetic effects. In: LEVEY, D.J.; SILVA, W.R.; GALETTI, M. **Seed Dispersal and Frugivory: Ecology, Evolution, and Conservation** (eds.). CABI Publishing, Wallingford, UK, p.305–321.

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, n.32, p.65-70.

KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L.A.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M.B.; VENCOVSKY, R. 2001. Genetic diversity in tropical tree species from different successional stages determined with genetic markers. **Scientia Forestalis**. Piracicaba, v.64, p.93-107.

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**, Oxford, v.16, p.1099-1106.

KIERULFF, M.C.M.; RYLANDS, A.B.; MENDES, S.L.; OLIVEIRA, M.M. 2008. *Leontopithecus chrysomelas*. In: IUCN 2012. Red List of Threatened Species. Version 2012.2.

LAGOS, A. R.; MULLER, B. L. A. 2007. Hotspot Brasileiro: Mata Atlântica. **Saúde & Ambiente**, v.2, n.2, p.35-47.

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

LANTYER SILVA, A.S.F.; NEVES, M.L.; MARIANO-NETO, E. 2009. Densidade e distribuição espacial de três espécies de *Manilkara* sp. (Sapotaceae) no sul da Bahia (Brasil). **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**, p.1-3.

LEAL, J.B. **Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Cariniana legalis* Mart. O. Kuntze (jequitibá-rosa)**. 2013. 86p. Tese de (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus.

LEGENDRE, P.; FORTIN, M.J. 1989. Spatial pattern and ecological analysis. **Vegetatio**, v.80, p 107-138.

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, p.398-401.

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

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.15, p.65–95.

MAGALHÃES, D.M.A.; LUZ, E.D.M.N.; MAGALHÃES, A. F.; FILHO, L.P.S.; LOGUERCIO, L.L.; BEZERRA, J.L. 2011. Riqueza de fungos anamorfos na serapilheira de *Manilkara maxima*, *Parinari alvimii* e *Harleyodendron unifoliolatum* na Mata Atlântica do Sul da Bahia. **Acta Botanica Brasilica**, v25, n.4, p.899-907.

MANTOVANI, W. **Estrutura e dinâmica da floresta atlântica na Juréia, Iguape - SP**. 1993. 126p. Tese de (Livre Docência) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo SP.

MARCHIORETTO, M.S.; WINDISCH, P.G; JOSAFÁ, C.S. 2004. Padrões de distribuição geográfica das espécies de *Froelichia* Moench e *Froelichiella* R.E. Fries (Amaranthaceae) no Brasil. **Série Botânica Iheringia**, v.59, n.2, p.149-159.

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

MARTINS, K. **Diversidade genética e fluxo gênico via pólen e semente em populações de *Solanum lycocarpum* ST.HIL. (Solanaceae) no sudeste de Goiás.** 2005. 128p. Tese de (Doutorado em em Agronomia, na Área de Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.

MARTINS, K.; CHAVES, L.J.; BUSO, G.S.C.; KAGEYAMA, P.Y. 2006. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics.** v.7, p.957-969.

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

MARTINS, P, S. 1987. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. **Série técnica, IPEF,** n.35, p.71-78.

MELO, C.V.V.D. **DNA barcode em espécies arbóreas de Sapotaceae da Mata Atlântica.** 2012. 86p. Dissertação de (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.

MCKEY, D. 1975. The ecology of coevolved seed dispersal systems. In: GILBERT, L.E.; RAVEN, P.H. (eds.). **Coevolution of animals and plants.** Austin: University of texas, p.159-191.

MITTERMEIER, R.A.; MYERS, N.; THOMSEN, J.B.; DA FONSECA, G.A.B.; OLIVIERI, S. 1998. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas:

approachs to setting conservation priorities. **Conservation Biology**, v.12, n.3, p.516-520.

MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). 2013. >> Biomass>> Mata Atlântica. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acessado em: 18 de dez. 2012.

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

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

MORI, S.A.; BRIAN, M.B.; PRANCE, G.T. 1981. Distribution patterns and conservation of eastern Brazilian coastal forest tree species. **Brittonia**, v.33, n.2, p.233-245.

MOURA, T.M. **Estrutura genética populacional em lobeira (*Solanum lycocarpum* A. St.-Hil., Solanaceae), em ambientes naturais e antropizados no estado de Goiás**. 2007. 97p. Dissertação de (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.

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

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

NASON, J.D.; HERRE, E.A.; HAMRICK, J.L., 1998. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. **Nature**, v.391, p.685–687.

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

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

NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v.13, n.5, p.1143-1155.

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**, v.13, p.60-70.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v.4, p.347–354.

PARDINI, R. **Pequenos mamíferos e a fragmentação da Mata Atlântica de Una, Sul da Bahia - Processos e Conservação**. 2001. Tese de Doutorado em Zoologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

PARDINI, R.; FARIA, D.; ACCACIO, G.M.; LAPS, R.R.; MARIANO-NETO, E.; PACIENCIA, M.L.B.; DIXO, M.; BAUMGARTEN, J. 2009. The challenge of maintaining Atlantic Forest biodiversity: A multi-taxa conservation assessment of specialist and generalist species in na agro-forestry mosaic in southern Bahia. **Biological Conservation**, v.142, n. 6, p.1178-1190.

PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v.79, n.2, p.361-382.

PELISSIER, R.; GOREAUD, F. 2013. ads: Spatial point patterns analysis. R package version 1.3-3. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=ads>>. Acesso em: 16 jun 2013.

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

PENNINGTON, T.D. 2004. Sapotaceae. In: Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson, A.; Stevenson, D.W.; Heald, S.V. (eds) **Flowering Plants of the Neotropics**. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA, p.342-344.

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

PESSOA, M.S.; VLEESCHOUWER, K.M.; AMORIM, A.M.; TALORA, D.C. 2011. **Calendário fenológico**: Uma ferramenta para auxiliar no cultivo de espécies arbóreas nativas da floresta atlântica no sul da Bahia. Ilhéus: Editus. v.1, 128p, 2011.

PIRES O'BRIEN, J. 1998. *Manilkara maxima*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**, v.1, n.7, 215-222.

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, p.449-467.

RAFALSKI, J.A., MORGANTE, M., POWELL, W., VOGEL, J.M. AND TINGEY, S. V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. (eds.). **Analysis of non- mammalian genomes - a practical guide**. Academic Press, New York, p.75-134.

RAMBALDI, D.M.; OLIVEIRA, D.A.S. 2003. Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 510p.

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

RIPLEY, B.D. 1976. The second-order analysis of stationary point processes. **Journal of Applied Probability**, v.13, p.255-266.

RIZZINI, C.T. 1997. **Tratado de fitogeografia do Brasil- aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. Rio de Janeiro. Ed. Àmbito cultural. 747p.

RYLANDS, A.B.; KIERULFF, M.C.M. 2008. *Callithrix kuhlii*. In: IUCN 2012. Red List of Threatened Species. Version 2012.2.

SAMBUICHI, R.H.R. 2006 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, n.1, p.89-101,.

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

SCHNABEL, A.; NASON, J.D.; HAMRICK, J.L. 1998. Understanding the population genetic structure of *Gleditsia triacanthos* L.: seed dispersal and variation in female reproductive success. **Molecular Ecology**. v.7, p.819–832.

SCHNEIDER, M.P.C.; BATISTA, C.G.; CARVALHO, D.; CERQUEIRA, R.; CIAMPI, A.Y.; FRANCESCHINELLI, E.V.; GENTILE, R.; GONÇALVES, E.C.; GRATIVOL, A.D.; NASCIMENTO, M.T.; PÓVOA, J.R.; VASCONCELOS, G.M.P.; WADT, L.H.; WIEDERHECKER, H.C. 2003. Genética de populações

naturais. In: **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Ministério do Meio ambiente-Secretária Biodiversidade e Florestas, Brasília-DF, p.297-315.

SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v.9, p.615-629.

SEZEN, U.U.; CHAZDON, R.L.; HOLSINGER, K.E. 2005. Genetic consequences of tropical second-growth forest regeneration. **Science**, Washington, v.307, n.5711, p.891.

SHAPCOTT, A. 1995. The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). **Heredity**, v.74, p.28-38.

SILVA, J.M.C.; CASTELLETTI, C.H.M. 2003. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA I.G. (eds.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook**. Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, Washington, D.C. p.43-59.

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, p.85–92.

SLATKIN, M. 1981. Estimating level of gene flow in natural populations. **Genetics**, v.99, p.323-335.

SLATKIN, M. 1985. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systems**, Palo Alto, v.16, p.393-430.

SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. 1978. Spatial autocorrelation in biology:1. Methodology. **Biological Journal of the Linnean Society London**, v.10, p.199–228.

SORK, V.L.; NASON, J.; CAMPBELL, D.R.; FERNÁNDEZ, J.F. 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v.14, n.6, p.219-224.

TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C.; GASCON, C. 2004. Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of neotropical forests. **Biodiversity and Conservation**, v.13, p.1419–1425.

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, n.1, p.181-188.

TAUTZ, D. 1989. Hypervariable simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research** v.17, p.6463–6471.

TARAZI, R. **Diversidade genética, estrutura genética especial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no cerrado**. 2009. 139p. Tese de (Doutorado em Agronomia, na Área de Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.

TARAZI, R.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOSKY, R. 2013. Long-distance dispersal in a fire- and livestock-protected savanna. **Ecology and Evolution**, v.3, n.4, p.1003-1015.

TEMPLE, S.A. 1997. Maintaining the integrity of managed ecosystems: the challenges of preserving rare species. In: BOYCE, M.S.; HANEY, A. **Ecosystem management**. New Haven: Yale University Press, p.77-93.

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, p.311-322.

THOMAS W.W.; JARDIM J.G.; FIASCHI P.; AMORIM A.M. 2003. Lista preliminar das angiospermas localmente endêmicas do sul da Bahia e norte do Espírito Santo, Brasil (Preliminary list of locally endemic plants of southern Bahia and northern Espírito Santo, Brazil). In: PRADO , P.I.; LANDAU, E.C.; MOURA, R.T.; PINTO, L.P.S.; FONSECA, G.A.B.; ALGER, K. (orgs.) **Corredor de Biodiversidade da Mata Atlântica do Sul da Bahia**, p.1-9.

WEIR, B.S. 1996. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. **Sinauer Associates**, Sunderland, 445p.

WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenetics**, London, v.15, p.322–354.

WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, Lancaster, v.19, n.3, p.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, p.413-418.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* dc utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130p. Tese de (Doutorado em Agronomia, na Área de Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.