



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

FLORA BITTENCOURT

ESTRUTURA GENÉTICA DE *Virola officinalis* Warb. (MYRISTICACEAE) EM  
FRAGMENTOS FLORESTAIS IMERSOS EM PAISAGENS COM DIFERENTES  
PORCENTAGENS DE COBERTURA VEGETAL.

---

PPG Ecologia da Conservação



Universidade Estadual de Santa Cruz

---

ILHÉUS, BAHIA

2013

# FLORA BITTENCOURT

ESTRUTURA GENÉTICA DE *Virola officinalis* Warb. (MYRISTICACEAE) EM  
FRAGMENTOS FLORESTAIS IMERSOS EM PAISAGENS COM DIFERENTES  
PORCENTAGENS DE COBERTURA VEGETAL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Estadual de Santa Cruz, para a obtenção do Título de Mestre em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Orientador: Dr<sup>a</sup> Fernanda Amato Gaiotto

Co-orientador: Dr. Roberto Tarazi

ILHÉUS, BAHIA

2013

B624

Bittencourt, Flora.

Estrutura genética de *virola officinalis* Warb (Myristicaceae) em fragmentos florestais imersos em paisagens com diferentes porcentagens de cobertura vegetal / Flora Bittencourt. – Ilhéus, BA: UESC, 2013.

xii, 91f. : il. ; anexos.

Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Inclui referências.

1. Florestas tropicais – Conservação . 2. Ecologia florestal. 3. Genética vegetal. I. Título.

CDD 577.34

FLORA BITTENCOURT

ESTRUTURA GENÉTICA DE *Viola officinalis* (MYRISTICACEAE) EM  
FRAGMENTOS FLORESTAIS IMERSOS EM PAISAGENS COM DIFERENTES  
PORCENTAGENS DE COBERTURA VEGETAL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e  
Conservação da Biodiversidade da Universidade Estadual de Santa Cruz, para a  
obtenção do Título de Mestre em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Comissão examinadora:

---

Dr<sup>a</sup> Fernanda Amato Gaiotto  
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

---

Dr<sup>a</sup> Deborah Maria de Faria  
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

---

Dr<sup>a</sup> Karina Martins  
Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR

---

Dr<sup>a</sup> Flavio Gandara  
Universidade de São Paulo - ESALQ/USP

Teimamos  
em observar  
o que as lunetas  
nos oferecem.  
O céu não é só isto  
e nossos olhos  
não são só estes...

Damário Cruz



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Regina, por todo apoio, compreensão e carinho. Por sua imensa atenção, suporte e dedicação durante toda a minha vida, promovendo tudo o que eu precisava em muito mais. Saiba que este é o fruto da sua credibilidade em mim, do seu investimento na minha educação e principalmente nas minhas referências pessoais. Carrego no meu coração um exemplo de pessoa, de mulher, de profissional, de mãe, de amor. Muito obrigada por tudo, pois tudo o que eu sou hoje eu devo a você. Eu amo muito você.

Agradeço imensamente a minha orientadora Fernanda, por ter confiado em mim e me permitido acreditar em mim mesma. Mais do que técnicas, Fernanda me ensinou a ser mais humana, me mostrando que a compreensão e acolhimento são fundamentais para nossa formação. Soube entender que momentos difíceis apareceram e estive sempre ao meu lado. Me pegou pela mão e me instruiu desde o básico ao complexo, sempre com leveza no olhar, sorriso nos lábios e conhecimento interminável. Muito obrigada pelas horas de discussão, de análises, de risadas, de conselhos e principalmente de carinho.

Muito obrigada ao meu co-orientador Roberto, por toda a ajuda e apoio desde sempre, seja na bancada ou em reuniões e principalmente nas análises e discussões dos resultados. Sem a sua contribuição esse trabalho não seria uma realidade. Muito obrigada também pela compreensão nas ocasiões de ausência, pelas ligações de atenção, nunca de cobranças. Tudo isso foi fundamental para mim e fez surgir uma amizade valiosa. Muito obrigada.

Agradeço a Daniele França, minha parceira de campo, de bancada, com quem dividi durante todo esse tempo minhas aflições, angústias, felicidades, PCR's, géis e reagentes! Dani se tornou uma grande amiga para mim e eu a carrego comigo para o resto da vida. Pode contar comigo, para o que precisar.

Agradeço a Flavia Santana, por ter me trazido para Ilhéus e ter mudado minha vida para sempre! Além de me apresentar o paraíso, Flavia me proporcionou uma vida cheia de amigos e de muita felicidade, desde os tempos da graduação. Dividimos o quarto, ansiedades e aspirações. Minha amiga linda, muito obrigada por tudo.

Agradeço a Michaele Pessoa, minha amiga querida que contribuiu muito com o projeto, nas coletas, na metodologia, nos resultados e nas discussões! Estive presente em todas as etapas e me ensinou muito. Além do acadêmico, Michaele também me

ensinou muito sobre a vida e sobre como vivê-la. Demos muitas risadas e choramos muito também. Muito obrigada por tudo isso, Mimi.

Um agradecimento mais do que especial para Victória Lacerda, minha amiga de todas as horas, companheira, mais do que especial. Mesmo sem me conhecer, abriu as portas da sua casa e do seu coração para mim. Vic, sem você tudo isso não teria a menor graça. Morar contigo foi dividir tudo, a casa, despesas, felicidades, tristezas. Mas, na verdade, foi principalmente compartilhar. Será sempre um prazer ter você perto de mim. Muito obrigada e saiba que Ilhéus não é a mesma sem você aqui.

Quero agradecer imensamente a todos os queridos do Laboratório Marcadores Moleculares: Daniele França, Daniele Borges, Ramiris, Rodrigo, Caio, Acácia, Alessandro, Eullaysa, Isabela, Alan, Horlei, Sheila, Helen, Elaine Por todos os momentos, almoços, conversas, discussões acadêmicas, confraternizações e contribuições. Vocês são todos muito especiais.

Agradeço a André Amorim por me ajudar na identificação da espécie, ao Cássio vanBerg por ter permitido a utilização do laboratório e também pela recepção maravilhosa. Agradeço também a Maria Cristina Roberts por ter a disponibilidade em me receber e a paciência me ensinar a técnicas, análise de dados e de contribuir, sempre muito atenciosa, à realização deste trabalho. Aproveito para agradecer aos meus mestres de toda a vida, Anídia Rosa, Marcelo Rocha, Lília Moreira e Jorge Rabelo.

Quero agradecer ao projeto SISBIOTA e a coordenadora Dra. Deborah Faria, ao CNPq, a CAPES e a Universidade Estadual de Santa Cruz.

Muito obrigada ao meninos que me ajudaram em campo: Moacir, Lucas, José Lima, Bila, Diogo, José Carlos, Sr. Valtone e as meninas também: Daniele, Sheila, Helen e Michaele.

Agradeço aos professores e todas as pessoas que participam do Programa de Pós Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade da UESC, principalmente por incentivar o crescimento profissional de cada um de nós alunos. Um agradecimento especial para Iky, por toda atenção e praticidade nas resoluções dos problemas. Muito obrigada.

Muito obrigada a galera do Asilo Village, temporada 2010.2: Flavia, Victória, Carol, Cassiano, Michaele, Fred, Linaeus e agregados do asilo: Leticia, Nem, Saraiva, Dendê, Kikito, Romari, João e Lucas. Foi a melhor época da minha vida. Muito obrigada.

Agradeço a minha amiga de muitos anos e companheira de moradia Talita Thédiga, por toda a compreensão e apoio sempre. É muito bom estar ao seu lado e ver que a nossa amizade só cresce a cada dia. Muito obrigada minha amiga. Agradeço também a Nilo Santana, pelas risadas e amizade. É muito legal dividir a casa com vocês dois!

Agradeço a minha tia Carol Bittencourt por ter me ajudado financeiramente no início dessa caminhada e, muito além disso, por contribuir com a minha formação pessoal e a minha saúde mental nos momentos mais difíceis que eu já passei na vida. Eu amo você minha tia querida, muito obrigada.

Agradeço também a Valéria Miranda e César Menezes por segurar a barra enquanto eu estava dedicada aos estudos. Muito obrigada pelo apoio sempre e pelo enorme carinho. Ambos também são meus pais e são fundamentais na minha vida. Mais do que muito obrigado!

Agradeço muito ao meu companheiro Jeferson Rodrigues, meu amor, pela compreensão nos momentos de dedicação aos estudos, pelas horas intermináveis no laboratório e ausências nos finais de semana. Sou grata, e muito feliz, pela atenção, pela ajuda, no cuidado comigo, por me fazer sorrir e principalmente por me fazer amar. Muito obrigada por dividir a vida comigo e acreditar na felicidade a dois. Viver ao seu lado é uma coisa maravilhosa.

Viva Santo Antônio!



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fisionomia de paisagem de remanescente florestal em Una (A) e em Belmonte (B), com 70% e 15% de cobertura florestal, respectivamente.....13
- Figura 2. Indivíduo jovem de *Virola officinalis*.....15
- Figura 3. Fisionomia de paisagem em Belmonte. Plantação de eucalipto (*Eucalypto ssp.*).....27
- Figura 4. *Virola officinalis*. A – ramo foliar, detalhe dos tricomas. B – corte do caule. C – fruto. D – inflorescência.....34
- Figura 5: Fisionomia de um remanescente florestal no sítio 118.1, em Belmonte, Bahia.....55
- Figura 6: Delineamento amostral do Projeto SISBIOTA.....56
- Figura 7: Localização e porcentagem dos sítios amostrados.....57
- Figura 8: Distribuição de árvores nos locais amostrados.....59
- Figura 9. Relação entre  $F_{ST}$  e  $H_E$ , a partir do modelo de migração de Ilhas, para detecção de valor muito alto ou muito baixo de  $F_{ST}$ , comparado às expectativas de neutralidade dos marcadores microssatélites.....60
- Figura 10: Comparação entre os Sítios de coleta e as estimativas de diversidade. Barras de Erro padrão foram inseridas.  $H_E$  = heterozigosidade esperada /  $H_O$  = heterozigosidade observada /  $F_{IS}$  = índice de fixação.....63

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.Characteristics of 21 microsatellite loci developed for *Virola officinalis*.....48
- Tabela 2.Genetic characterization of 16 microsatellite loci in three populations of *Virola officinalis*.  $A$  = number of alleles /  $H_o$  = observed heterozygosity /  $H_E$  = expected heterozygosity /  $Q$  = Combined Probability of Exclusion /  $I$  = probability of identity /  $F$  = fixation index.....49
- Tabela 3. Comparação entre as médias dos parâmetros estimados por população com 12 e 15 locos microssatélites.....62
- Tabela 4.  $F_{ST}$  e distância geográfica entre populações amostradas.....62

## EXTRATO

A perda de cobertura florestal é um dos grandes problemas enfrentados pela Floresta Ombrófila Densa do Sul da Bahia. Por diminuir substancialmente as áreas dos remanescentes ainda existentes, esse processo desencadeia uma série de complicações à qualidade ambiental da paisagem, como aumento do efeito de borda, da luminosidade na mata, estresse hídrico do solo e conseqüentemente das raízes, perda de habitat para muitas espécies dos diversos grupos taxonômicos e problemas no fluxo gênico e na dispersão de sementes no ambiente. Como consequência, há substituição de especialistas por generalistas e comprometimento da cadeia trófica, por exemplo. Para espécies climáticas ou secundárias tardias, a perda de cobertura florestal poderá afetar o seu recrutamento, por tornar o ambiente não habitável. Assim, observa-se influência na diversidade e estrutura genética das diferentes populações assim formadas após processos de isolamento dos fragmentos florestais. Para diagnosticar, entender e tentar propor formas para diminuir os problemas gerados por essa situação, o desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites específicos é indicado, pois são capazes de desvendar inter-relações entre indivíduos e entre populações, proporcionando grande conhecimento sobre a espécie para o qual foi construído e possivelmente para outras, em que a sua transferência seja possível. Nesta investigação, objetivou-se conhecer a estrutura genética em quatro populações de *Virola officinalis* existentes em remanescentes florestais inseridos em paisagens com diferentes porcentagens de cobertura florestal, nos Municípios de Una e Belmonte, no Sul da Bahia. Para isso, foram desenvolvidos 21 microssatélites específicos para a espécie, através de tecnologia NGS (*Next Generation Sequence*). A caracterização dos locos apresentou os marcadores como eficientes para estudos evolutivos e ecológicos, assim como em investigações sobre paternidade. Nenhum dos locos apresentou desequilíbrio de ligação quando aplicado a correção de Bonferroni ( $p \leq 0.000417$ ). Após o desenvolvimento e caracterização dos locos, os 15 considerados polimórficos foram utilizados para investigar a estrutura genética das populações. A busca por locos *outliers* apresentou a existência de 3 possíveis locos sob seleção e as análises que os continham diferiram daquelas sem os mesmos. Observamos que a retirada desses locos diminuiu o intervalo de confiança das análises realizadas e, portanto, 12 foram os locos utilizados para diagnóstico das populações da *V. officinalis*. Quanto a diversidade genética entre populações não observou-se valor significativos, porém ao analisar as populações por pares, observou-se que a da porcentagem de cobertura florestal poderia estar contribuindo para a redução da diversidade gênica, assim como para o aumento da endogamia. Duas possíveis explicações foram sugeridas, (1) a dispersão poderia estar ocorrendo frente ao modelo de alondras ou (2) a pouca diferença encontrada da diversidade entre as populações seria devido a longevidade, associado com a alta diversidade genética naturalmente apresentadas por arbóreas e histórico de substituição das florestas por áreas de utilidade antropológicas. Acredita-se que a segunda hipótese esclarece melhor os resultados, pois ao analisar o isolamento por distância (teste de mantel Parcial) o mesmo não apresentou-se significativo. Ao final desta investigação sugere-se que esforços para conservação da biodiversidade sejam voltados às áreas com maior porcentagem de cobertura florestal, favorecendo a continuidade da diversidade ainda preservada. Para fragmentos com menor porcentagem é necessário estimular o aumento da qualidade do entorno dos remanescentes. Ações como o estímulo ao sistema de plantio agroflorestal e a manutenção da biodiversidade ainda existente são fundamentais para a continuidade da Floresta Ombrófila Densa do Sul da Bahia, considerada como *hotspot* da biodiversidade.

## ABSTRACT

The regional-scale decline in forest cover is one of the major problems faced by the Rain Forest of Southern Bahia. Reducing substantially the remaining areas, this process triggers a series of complications to the environmental quality of the landscape, such as increased edge effect, the high light in the forest, roots and soil water stress, habitat loss for many species of different taxonomic groups and problems with gene flow and seed dispersal in the environment. As a consequence, replacement specialists by generalists and compromised food chain, for example. To climax or late secondary species, the forest decline can affect your recruitment making the environment uninhabitable. Thus, there is an influence on genetic diversity and the different populations structure thus formed after isolation processes of forest fragments. To diagnose, understand and try to propose ways to reduce the problems created by this situation, the development of microsatellite markers for specific is able to unravel the interrelationships between individuals and populations, providing great knowledge of the target species and others, that the transfer is possible. This research aimed to understand the genetic structure of four populations of *Virola officinalis* in forest remnants embedded in landscapes with different percentages of forest cover, on municipalities of Una and Belmonte in southern Bahia. For this, were developed 21 microsatellite using NGS (Next Generation Sequence). The loci characterization presented as efficient markers for evolutionary and ecological studies, as well as research on fatherhood. None of the loci showed linkage disequilibrium when applied Bonferroni correction ( $p \leq 0.000417$ ). After the development and characterization, the 15 polymorphic loci were used to investigate the genetic structure of populations. The search for outlier loci showed the existence of three possible loci under selection and analysis that contained that differ from those without them. We observed that the removal of these loci decreased the confidence interval of the analyzes and therefore 12 loci were used for diagnosis of hollow populations of *V. officinalis*. The genetic diversity between populations doesn't showed significant value, but when analyzing peer-to-peer population, we observed that the decline of forest cover percentage may be contributing to the reduction of genetic diversity, as well as the increase of inbreeding. Two possible explanations have been suggested, (1) the dispersion could be follow the stepping stones or (2) the little difference in diversity between populations can be explain due the longevity, coupled with high genetic diversity naturally presented on tree and history replacement of forests to anthropological utility areas. The author believes that the second hypothesis is the best for explains the results, because when analyzing the isolation by distance (partial Mantel test) it was not significant. Biodiversity conservation efforts should be directed to areas with the highest percentage of forest cover, promoting continuity of diversity still preserved. For fragments with lower percentage is necessary to increase in the quality of the forest remaining. Encouraging the planting agroforestry system and support of biodiversity that still exists are critical to the continuity of Rain Forest of Southern Bahia, considered as hotspot biodiversity.

## ÍNDICE

Agradecimentos.....	V
Lista de Figuras.....	VIII
Lista de Tabelas.....	IX
Extrato.....	X
Abstract.....	XI
Introdução Geral.....	13
Revisão Bibliográfica.....	18
1. Limiar de Perda de Habitat.....	18
2. Ecologia de Paisagem.....	22
3. Floresta Ombrófila Densa do Sul da Bahia.....	23
3.1 Perda de habitat e fragmentação da Floresta Ombrófila Densa do Sul da Bahia.....	24
4. Família Myristicaceae.....	30
4.1 Gênero <i>Virola</i> .....	32
5. Microssatélites e Estrutura Genética.....	39
Capítulo 1 – Development of microsatellite markers for <i>Virola officinalis</i> Warb. (Myristicaceae), an endemic tree of the Brazilian Atlantic Rain Forest bynext generation sequencing technology.....	44
Capítulo 2 - Estrutura genética de <i>Virola officinalis</i> Warb.(Myristicaceae) em fragmentos florestais imersos em paisagens com diferentes porcentagens de cobertura vegetal.....	51
Considerações Finais.....	73
Referências Consultadas.....	74
Anexo I.....	88
Anexo II.....	89

## INTRODUÇÃO GERAL

Descrita e admirada desde o descobrimento do Brasil, a Mata Atlântica está presente por todo o litoral brasileiro, assumindo as classificações de Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, manguezais, restingas, campos de altitude e brejos interioranos de acordo com o relevo, clima e altitude (RIZZINI, 1963). Sua extensão, através de 27 graus de latitude no Brasil, é responsável pela diversidade em relevo, fitogeografia, pluviometria e conseqüentemente em espécies (SILVA; TABARELLI, 2000; LEITÃO-FILHO, 1982).

Na Floresta Ombrófila Densa do Sul da Bahia, observa-se clima do tipo Af quente e úmido sem estação seca e com precipitação anual superior a 1.300 mm (KOEPPEN, 1948). É caracterizada como área de grande biodiversidade, podendo conter cerca de 450 espécies vegetais por hectare (MARTINI, 2002), além de espécies animais, fungos etc. Neste montante estima-se grande número de endemismos, responsáveis pela classificação de *hotspot* desta região (LAURENCE, 2009).

Faria et al. (2009) afirmam que uma variedade de distúrbios causados por atividades humanas resultam na formação da paisagem variegada que observamos atualmente na região de Una e de Belmonte, no sul da Bahia. Investigações acerca do comportamento da comunidade existente nessas áreas tornam-se importantes para o desenvolvimento de metodologias agropecuárias menos agressivas à biodiversidade local (SILVA; TABARELLI, 2000).



Figura 1. Fisionomia de paisagem de remanescente florestal em Una (A) e em Belmonte (B), com 70% e 15% de cobertura florestal, respectivamente. Fotos: Flora Bittencourt. 2012.

Muitos autores defendem que a recuperação das áreas degradadas esteja intrinsecamente relacionada com a proteção dos remanescentes florestais, principalmente os núcleos dos fragmentos onde ainda encontram-se matas maduras ou secundárias tardias (SILVA; TABARELLI, 2000; MARTINI et al. 2007; AYRES et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2004). Dessa forma, a continuidade das espécies características destes ambientes dependerá da criação de reservas legais de proteção à natureza, da expansão das áreas protegidas, mesmo que divididas em categorias de uso privado, público ou proibido de atividades. O reflorestamento, a manutenção de corredores ecológicos entre fragmentos e sistemas agroflorestais de uso da terra também são estratégias de conservação consideradas (AYRES et al. 2005).

A utilização de espécies nativas em sistemas agroflorestais, como árvores para o sombreamento do plantio de cacau (conhecido na região pelo termo "cabruca"), é apontada por alguns autores como a responsável pela manutenção de espécies arbóreas e da fauna capaz de utilizar os recursos disponíveis por essa atividade (GOUVEIA, 2009; SAMBUICHI, 2003; MARTINI, 2002). O gênero *Virola*, por exemplo, é descrito como útil para sombreamento nesse tipo de cultivo, além de favorecer a fauna local com a disponibilidade de recurso nutricional (OLIVEIRA JUNIOR; CABREIRA, 2011).

Por tratar-se de uma espécie pioneira, capaz de recrutar em local com muita luminosidade (RODRIGUES, 1980), a bicuiba (*Virola officinalis*) poderá ser empregada em Sistemas Agrícolas Florestais (SAF), na produção de muitos derivados de madeira, em programas de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas nos locais onde ela naturalmente ocorre (CARVALHO, 2003). Rodrigues (1980) descreve a espécie como semidecídua, heliófita, lenhosa. Alcança rapidamente tamanho suficiente para ultrapassar o dossel de árvores mais antigas. Devido a essas características, estudos sobre a espécie podem contribuir para a compreensão das relações existentes entre a fauna e a flora local e sobre a situação sucessional das paisagens investigadas.

Acredita-se que populações da espécie poderão apresentar alterações nas estimativas dos índices de diversidade genética relacionados à perda de cobertura florestal, sendo avaliada nesta investigação a relação entre esse fator e a situação genética das populações em diferentes manchas florestais distribuídas na paisagem. Investigações sobre a estrutura genética podem ser correlacionados com a fragmentação, a perda de habitat e subdivisão populacional, a fim de encontrar possíveis interpretações para os resultados estimados (FARIAS, 2010).



Figura 2. Indivíduo jovem de *Virola officinalis*. Foto: Flora Bittencourt, 2012

Processos como fragmentação e redução de habitat podem estar relacionados, porém a perda do habitat acontece quando o local de sobrevivência de determinada espécie sofre danos ou é modificado de tal forma que não apresenta mais determinadas características relevantes à sobrevivência da espécie em questão. Isso poderá acontecer após fragmentação ou outro evento condicionante (ANDRÉN, 1994). Até o momento, todas as investigações apontam o efeito da perda de habitat maior do que o efeito da fragmentação para a existência de um limiar de extinção (FAHRIG, 2002)

O limiar para um processo ecológico deverá ser compreendido como um ponto de mudança drástica na população ou comunidade em estudo, em um rápido intervalo de alteração na porcentagem de habitat para a espécie alvo (ZUCKERBERG; PORTER, 2010; FAHRIG, 2003). A capacidade de movimentação dos organismos, o fluxo gênico, a dispersão e a viabilidade da população são caracterizadas principalmente pela qualidade do entorno, ou seja, da heterogeneidade espacial (OLIVEIRA et al. 2004; CROUZEILLES et al. 2010; FARIA et al. 2009; SOLÓRZANO et al. 2009). Portanto, processos relacionados à redução ou perda de habitat poderão conduzir para uma situação extrema, um limiar de extinção, por decrescer a ocupação das áreas vizinhas aos fragmentos de habitat isolados, diminuindo interação, processos e consequentemente a funcionalidade do sistema (BENDER et al, 1998).



Farigh (2002) e Zuckerberg e Porter (2010) sugerem que o estudo sobre limiares poderá direcionar esforços para gestão e monitoramento da paisagem, porém deve-se ter cautela ao utilizar limiares ecológicos para atividades de gestão, manejo e restauração ambiental, pois apesar da existência de investigações sobre o tema, é necessário que seja sob o princípio da precaução. A negligência de variáveis ambientais nas atividades práticas de cuidados com o meio ambiente poderá desencadear outros limiares ecológicos prejudiciais ao ecossistema e, conseqüentemente, inutilizar esforços de preservações e econômicos (DODDS et al. 2010).

Mirando-se a genética de populações, observamos que a perda de habitat poderia afetar o fluxo gênico, sistemas de acasalamento e processos evolutivos, assim como induzir efeitos gargalo imediatamente após a sua ocorrência (BITTENCOURT; SEBBENN, 2009). Porém, a perda de diversidade genética nem sempre é bem percebida em populações arbóreas, pois os indivíduos adultos poderão estar no ambiente há muitos anos, refletindo uma característica ambiental antepassada, dificultando a avaliação da deriva genética (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Para conservação das espécies arbóreas existentes nos remanescentes florestais resultante da fragmentação e perda de habitat, investigar a estrutura genética torna-se um importante instrumento de avaliação de viabilidade e aptidão, afinal o processo de desmatamento e conseqüente perda da cobertura florestal poderá resultar em diferentes e complexas conseqüências para a habilidade evolutiva das populações remanescentes (APARICIO et al. 2011).

A Estrutura genética pode ser compreendida a partir dos resultados dos fenômenos de migração, mutação, seleção e deriva genética, influenciados por processos ecológicos, reprodução e dispersão dos genes através dos indivíduos de uma população (JAIN, 1976). Em populações estruturadas, existe uma distribuição não aleatória dos aelos e genótipos no espaço e no tempo, que pode levar ao aumento da endogamia e ao comprometimento da diversidade genética.

A existência de estruturação genética nas populações de espécies que se reproduzem preferencialmente através de cruzamentos pode revelarum déficit de fluxo gênico. Assim, um possível aumento dos acasalamentos entre indivíduos aparentados e de cruzamentos biparentais pode culminar nas combinações de alelos deletérios recessivos provocando uma situação antagônica entre a diminuição do valor adaptativo e o aumento do comprometimento da população investigada (ZUCCHI, 2002).

Dentre os marcadores moleculares existentes, destaca-se os codominantes e polimórficos microssatélites como indicados para investigações sobre variabilidade genética, cálculos de frequência alélica, aderência ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg, mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e testes de paternidade (RISTERUCCI et al, 2005). Assim, esses marcadores moleculares são capazes de fornecer muitas informações sobre a genética de uma população, contribuindo para medidas de conservação, relações filogenéticas entre táxons e no melhoramento, por exemplo (AVISE, 2010). Entretanto, apesar de extremamente eficaz para estudos genéticos, este marcador deve ser desenvolvido individualmente para cada espécie, através de sequenciamento genômico de regiões ricas em DNA repetitivo. Para a maioria das espécies arbóreas tropicais, como é o caso de *V. officinalis* esta ferramenta ainda era inexistente.

Com esta investigação objetivou-se desenvolver marcadores microssatélites específicos e utilizá-los como ferramentas para inferir sobre a estrutura genética para *V. officinalis*, permitindo testar a influência da porcentagem de cobertura vegetal existente para a manutenção dos recursos genéticos da espécie, além de contribuir com sugestões que podem diminuir as consequências genético-demográficas da fragmentação.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. LIMIAR DE PERDA DE HABITAT

O limiar para um processo ecológico deverá ser compreendido como um ponto de mudança drástica na população ou comunidade em estudo, em um rápido intervalo de alteração na porcentagem de habitat para a espécie alvo (ZUCKERBERG; PORTER, 2010; FAHRIG, 2003). Neste caso, observa-se a não linearidade entre a variável testada e a porcentagem de perda de habitat, havendo um limite determinante para manutenção do equilíbrio da população, processo ou funcionalidade do ecossistema (ANDRÉN, 1994).

Segundo Fahrig (2002) o estudo acerca do limiar de extinção em ambientes fragmentados requer paisagens com diferentes porcentagens de habitat a fim de realizar uma comparação entre as populações nos diversos ambientes estudados. Pensando no poder de inferência estatística, quanto maior for a diversidade  $\beta$ , ou seja, a heterogeneidade ambiental, maior a necessidade do número de réplicas na paisagem (PIVELLO; METZGER, 2007). Torna-se relevante conceituar dois processos diferentes, porém interconectados: fragmentação e perda de habitat. A fragmentação ocorre quando se subdivide áreas originalmente contínuas, gerando isolados de habitat uns dos outros, imersos numa matriz, conceituada como porção de paisagem não hábitat no entorno do fragmento, que poderá ser uma plantação, estradas, pomares ou pasto, por exemplo (EWERS; DIDHAM, 2006; BENDER et al. 1998; ANDRÉN, 1994). Perda de habitat, isolamento e aumento da borda serão efeitos cumulativos desse processo (DIGIOVINAZZO et al. 2010; BENDER et al. 1998).

A perda de habitat acontece quando o local de sobrevivência de determinada espécie sofre danos ou é modificado de forma a não apresentar mais determinadas características relevantes à condição de habitat, isso poderá acontecer após fragmentação ou não. (ANDRÉN, 1994). Investigações indicam que a diminuição de diversidade é um efeito da perda de habitat e a fragmentação pode ou não ser a razão para esta situação (FAHRIG, 2002). Fischer e Lindenmayer (2007) explicam que habitat é um conceito relacionado à espécie e não deve ser considerado como sendo a vegetação nativa, por exemplo.

Os estágios iniciais de perda de habitat poderão levar ao declínio de uma população e um limiar de redução poderá ser determinante para o tamanho populacional original. (ANDRÉN, 1994). A perda de habitat tem um efeito maior na extinção de aves do que a fragmentação, por exemplo (FARIGH, 2002). Ao simular processos de fragmentação, as análises realizadas por Andrén (1994) indicaram haver um limiar entre 10 e 30% de conservação do habitat para manutenção da riqueza de espécies ou tamanho da população para aves e mamíferos. Outros autores também encontraram o limiar expresso nesta de porcentagem, como Radford et al. (2005), Fahrig (2003), Betts et al. (2007), Pardini et al. (2010).

Para compreensão dos processos decorrentes da perda de habitat como consequência da fragmentação, é necessário atentar para as propriedades de um fragmento (BENDER et al. 1998). Este é caracterizado principalmente pelo isolamento. Possui maior área de borda do que o contínuo original e sua distância a mancha vizinha aumentam exponencialmente com o passar do tempo (DIGIOVINAZZO et al. 2010).

Assim, para metapopulações, o processo de colonização e recolonização estarão comprometidos, pois as distâncias entre manchas dentro da paisagem poderão ser inalcançáveis a determinadas espécies. (ANDRÉN, 1994). Em escala de paisagem a persistência da população é delimitada pelas taxas globais de nascimentos e mortes nas manchas componentes do sistema (FAHRIG, 2002).

Portanto, processos relacionados a redução ou perda de habitat poderão alcançar um limiar de extinção por decrescer a ocupação das áreas vizinhas aos fragmentos de habitat isolados (BENDER et al. 1998). Se houverem muitas manchas próximas o suficiente para manutenção das visitas dos dispersores (ou a manutenção da dispersão em geral), então a persistência da população ou a colonização poderá acontecer (FAHRIG, 2002; DRINNAN, 2005).

Qian e Cuffney (2012) publicaram artigo em que discutem o desafio em detectar limiares ecológicos, visto que esses serão influenciados por uma conjuntura de dinâmicas complicadas não-lineares de múltiplos fatores relacionados ao ecossistema. Segundo os autores, a investigação deverá relacionar teorias ecológicas, evidências empíricas, análises de dados ou ainda modelagem para que não aponte um limite onde não existe.

A caracterização matemática dos limiares ecológicos ainda é pouco desenvolvida, apesar de sua importância (LINTZ et al. 2011). Para análises de dados em busca de limiares ecológicos, muitos autores realizam muitas análises, sendo elas:

análises de regressão linear, de regressão não-linear, de regressão múltipla, regressão quantílica (KING; BAKER, 2010) o teste de correlação de Spearman (DIGIOVINAZZO et al. 2010) e o coeficiente  $r$  de Pearson (BENDER et al. 1998).

Assim como ocorre com outros modelos complexos, a análise de dados relacionados a limiares ecológicos poderá reunir interações ecológicas, relações hierárquicas e outras formas de não-linearidade. Assim a avaliação quantitativa dos limiares em espaço n-dimensional não é tão simples de ser elaborada. Lintz et al. (2011) afirmam que uma análise de regressão não-paramétrica deverá ser considerada para análise dos dados complexos, n-dimensionais relacionados aos limiares ecológicos.

É claro que processos como esse poderão ser mensurados em longo prazo, observando o comportamento das espécies com o passar do tempo. Investigações pontuais tenderão a amostrar uma situação imediata, que poderá não ser representativa das consequências da perda do habitat a não ser em ambientes que sofreram perdas de habitat há algum tempo e já apresentem as mais variadas consequências (ANDRÉN, 1994; DRINNAN, 2005).

Na medida em que a porcentagem de habitat se torna menor, os modelos elaborados por Fahrig (2002) preveem o aumento da taxa de mortalidade em relação a taxa de nascimentos, diagnosticando diminuição populacional com possibilidade de extinção caso o processo continue. Além disso, com o aumento populacional, maior quantidade de habitat é necessário para a persistência da população. Os mesmos resultados foram descritos por Zuckerberg e Porter (2010) para aves na América do Norte. Além disso, Drinnan (2005) e Tabarelli et al. (2005) afirmam que fragmentos com 50 m<sup>2</sup> ou menores, são dominados pelo efeito de borda.

Bender et al. (1998) discutem o efeito do tamanho da mancha de habitat em relação às espécies da borda, do interior e de generalistas. Os autores afirmam que o efeito do tamanho da mancha (tamanho X densidade populacional), a perda de habitat e a fragmentação irão afetar a abundância das espécies de borda e do interior. Os generalistas sofrerão menor impacto no aumento do tamanho de borda, causado pela formação de um fragmento, por exemplo. Por outro lado, se a taxa de reprodução de uma espécie é extremamente alta, em uma pequena porcentagem de habitat a população poderá persistir (FAHRIG, 2002).

Drinnan (2005) o limiar poderá não estar representando o ponto crítico para riqueza de espécies, mas será representativo para composição da comunidade, influenciando nos processos e na funcionalidade do ecossistema. É importante salientar

que a perda de espécies em um ecossistema poderá desestabilizá-lo, provocando outras perdas graves ou aumentando o número de espécies exóticas invasoras e/ou altamente competitivas (METZGER, 2010; BENDER et al. 2008; FORMAN, 1995).

Para plantas, o limiar para diminuição de diversidade genética pode ser discutido frente ao tempo de vida de um indivíduo arbóreo, por exemplo (LINDENMAYER; LUCK, 2005). Por sobreviver durante muitos anos, o histórico de perda de habitat poderá influenciar nos processos relacionados a polinização e dispersão de sementes, mas a presença dos indivíduos adultos é anterior a esse acontecimento (DRINNAN, 2005). Assim, apesar de poder refletir uma diversidade genética alta, a manutenção desta para gerações seguintes estará comprometida.

Mirando-se a genética de populações, observamos que a perda de habitat poderá afetar processos evolutivos, fluxo gênico e sistemas de acasalamento, assim como induzir efeitos gargalo imediatamente após a sua ocorrência. (BITTENCOURT; SEBBENN, 2009). Endogamia e deriva genética também poderão ser assistidos, afetando a diversidade genética para espécies investigadas. Numa paisagem fragmentada, a ausência de fluxo gênico poderá permitir a estruturação das populações em manchas de habitat isoladas (BALKENHOL et al. 2009). Os indivíduos, então, serão próximos geneticamente uns dos outros, caracterizando a diminuição da diversidade genética e possível perda de alelos (VEKEMANS; HARDY, 2004).

A investigação sobre o limiar de perda de habitat para estruturação genética de uma população de plantas permitiu apresentar dados relevantes sobre a situação genética da população estudada, prevendo fenômenos graves, como a perda alélica e consequentemente aumento dos riscos de extinção para a espécie.

A movimentação da fauna poderá sofrer influência do isolamento de manchas de habitat, dificultando polinização e dispersão de sementes (FARIA et al. 2009). Assim, relações exclusivas entre a fauna e a flora poderão gerar graves consequências para a permanência dessas populações, uma vez que a existência de fauna dispersora poderá estar comprometida e, dessa forma, interromper interações ecológicas fundamentais para as espécies correlacionadas.

É importante salientar que a diminuição da porcentagem de cobertura florestal também poderá acarretar situações perigosas para a população humana, já que a fauna presente tentará encontrar novos lugares para viver, podendo aumentar a transmissão de doenças, utilizar animais domesticados para alimentação além de outras situações indesejáveis (PARDINI et al. 2010).

## 2. ECOLOGIA DE PAISAGEM

A ecologia de paisagem é conceituada como o estudo dos processos ecológicos gerados por uma situação espacial de estruturação e interatividade do ecossistema (PICKETT; CADENASSO, 1995). A partir de uma escala considerada, os estudos são baseados na heterogeneidade espaço-ambiental, na ocorrência e manutenção de populações, comunidades e processos (KOBLOITZ et al. 2011). Os mesmos autores afirmam que heterogeneidade ambiental é a principal causadora de descontinuidades de processos evolutivos. Assim, a capacidade de movimentação dos organismos, o fluxo gênico, a dispersão e a viabilidade da população são caracterizadas principalmente pela qualidade do entorno, ou seja, pela heterogeneidade espacial (SOLÓRZANO et al. 2009; OLIVEIRA; MONTEZUMA, 2010; CROUZEILLES et al. 2010; FARIA et al. 2009).

Ritter e Moro (2012) conceituaram paisagem como mosaico heterogêneo, interativo, caracterizado por um observador que identifica pelo menos um fator determinante da heterogeneidade e uma escala a ser considerada na investigação. De acordo com essa definição, os autores defendem a integração entre diferentes abordagens relacionadas à análise ambiental, já que a possibilidade de estudar diferentes escalas de paisagem permite a reunião de dados de organismos diversos, contribuindo para a compreensão de processos ecológicos no ecossistema. É claro que os habitats são diversos e espécie-específicos, portanto torna-se importante a determinação de escalas adequadas e metodologias bem delineadas para estudos sobre a ecologia de paisagens (PIVELLO; METZGER, 2007; BENDER et al. 1998).

Considerando a abordagem ecológica proposta por Metzger (2010), entende-se que o contexto da paisagem irá influenciar os processos ecológicos e genéticos das populações existentes e, dessa forma, a conservação da biodiversidade. Para estabelecer a comunicação entre manchas de habitat na paisagem, a conectividade estrutural e/ou funcional deverá existir (KOBLOITZ et al. 2011; DRINNAN, 2005).

Investigações na genética de paisagens agregam conhecimentos da genética de população, ecologia de paisagens e estatística espacial (MANEL; SEGELBACHER, 2009). Os desafios para desenvolvimento desse tipo de pesquisa vão desde a delimitação de uma escala física e temporal até a interdisciplinaridade das discussões acerca dos resultados, atentando às limitações analíticas da relação entre paisagem e

dados genéticos das espécies estudadas (BALKENHOL et al. 2009) O foco da maioria das investigações nesta área está no fluxo gênico entre manchas isoladas, de forma a compreender a distribuição da variação genética na paisagem estudada (BITTENCOURT;SEBBENN, 2009)

A situação binária considerada dentro da paisagem (habitat e não-habitat) é delimitada pela existência de uma matriz inóspita ao organismo considerado e neste contexto, a matriz possuirá a maior conectividade e a maior área de extensão dentro da paisagem (FORMAN, 1995; ANDRÉN, 1994). Entendendo que a permeabilidade da matriz é seletiva de acordo com a espécie considerada, a conectividade entre manchas de habitat será uma variável chave na estruturação espacial de processos ecológicos. (CROUZEILLES et al. 2010; FARIA et al. 2009).

Pivello e Metzger (2007) discutiram sobre a importância da abordagem quantitativa em investigações sobre ecologia de paisagens, afirmando que a maioria dos estudos apresenta caráter qualitativo. Uma das dificuldades para estudos quantitativos é a carência de registros dos processos históricos de utilização do ambiente por populações humanas antigas. Ao longo do tempo o ambiente poderá ter sofrido diversas interferências diferentes, dificultando a avaliação do grau de impacto destas na paisagem atual. Porém, a última intervenção provavelmente será a mais pronunciada, mesmo que não tenha sido a mais impactante e a investigação da área pode revelar resultantes ecológicas dúbias, consequência de perturbações em cascata (SOLÓRZANO; OLIVEIRA, 2009).

### **3. FLORESTA OMBRÓFILA DENSA DO SUL DA BAHIA**

A Mata Atlântica estende por todo o litoral brasileiro até chegar à Argentina, classificada como ponto quente (*hotspot*) para a conservação da biodiversidade, possui cerca 1,361 espécies endêmicas e atualmente 35,9% de sua área total protegida (MYERS et al. 2000). De acordo com o Decreto 750, de 10 de fevereiro de 1993, a composição da mata é heterogênea, sendo classificada como o mapa de vegetação do



Brasil, elaborado por Rizzini (1971): Floresta Ombrófila Densa Atlântica, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, manguezais, restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encraves florestais do Nordeste.

No Sul da Bahia, de acordo com o relevo, clima e altitude a Mata Atlântica assume as classificações de Floresta Ombrófila Densa, manguezal ou restinga (DA FONSECA, 1985). Em Una, município do Sul da Bahia, a vegetação investigada está classificada como Floresta Ombrófila Densa, pois apresenta índices termopluviométricos elevados, com distribuição de chuvas bem distribuída durante o ano, sem um período de seca definido (ELLEMBERG; MUELLER-DOMBOIS, 1956/66). É perenefolia, apresenta dossel até 50m, além de arvoretas, arbustos, samambaias, epífitas e bromélias (GOUVÊA, 1969). O relevo de topos concordantes, pouco elevados, clima tipo Af de acordo com a classificação de Köppen, caracterizado por apresentar precipitação anual superior a 1300 mm, concentradas nos meses de janeiro a abril, outubro a dezembro e no mês de agosto, não ocorrendo um período seco definido (KOEPPEN, 1948; IBAMA/MMA, 1998). As temperaturas anuais apresentam variação entre 24°C e 26°C no verão e 18 °C no inverno (MORI et al. 1983).

### **3.1 Perda de habitat e fragmentação da Floresta Ombrófila Densa do Sul da Bahia**

A floresta costeira denominada Floresta Ombrófila Densa por Azevedo (1950) está bastante desmatada e, onde existia floresta, atualmente abriga cerca de 40% da população brasileira e gera até 70% do PIB nacional (CI-BRASIL et al. 2000). Inicialmente, o litoral da Floresta Ombrófila Densa foi utilizado por populações de habitantes sambaquis cujas datações são estimadas em cerca de 6.000 anos. Posteriormente, os tupis, que praticavam agricultura de corte e queima, também ocuparam extensas áreas do litoral brasileiro (SOLÓRZANO et al. 2009).

Após o descobrimento do Brasil a área da Floresta Ombrófila Densa sofreu uma intensificação dos impactos ambientais, causados por uma grande invasão em busca das suas riquezas biológicas, como corte seletivo de árvores, principalmente o pau-brasil, e a caça, por exemplo (MAGNANINI; MAGNANINI, 2002). Dessa forma, o legado das diversas utilizações de terra por diferentes povos, gerou uma paisagem modificada, deixando marcas na paisagem anteriormente de floresta (SOLÓRZANO et al. 2009). O

seu tamanho vem sendo reduzido desde então, estando atualmente restrito a fragmentos de floresta pelo litoral brasileiro (AYRES et al. 2005).

Devido a essa realidade, cerca de 60% das espécies descritas como ameaçadas de extinção na lista oficial da fauna brasileira habitam esse bioma (SILVA; TABARELLI, 2000; PARDINI, 2004). Em relação aos mamíferos, uma em cada quatro espécies endêmicas registradas na Floresta Atlântica está ameaçada (PARDINI, 2004).

Ao longo dos anos de exploração para utilização madeireira foram selecionadas árvores grandes e saudáveis, retirando assim parte preciosa do material genético da região. As árvores que restaram, muitas susceptíveis a doenças, incapazes de atingir altura daquelas derrubadas, são as novas matrizes da floresta ombrófila densa. Cronistas, viajantes, estudiosos e os próprios colonizadores do Brasil, deixaram registros de existência de árvores gigantescas, para as quais seriam necessários muitos homens lado a lado para circunda-las, porém não há registros numéricos, quantitativos ou muito precisos sobre essas observações da flora brasileira. (MAGNANINI; MAGNANINI, 2002)

Iniciado pela extração do pau-brasil, grandes áreas de florestas foram desmatadas para promoção de atividades de agricultura e pecuária, principalmente pelos ciclos econômicos brasileiros (BIELSCHOWSKY, 1989). A cana de açúcar foi introduzida principalmente nas áreas costeiras e deu início a criação dos latifúndios. O café, borracha, algodão, o ciclo do minério e o consumo de carvão vegetal também são consideradas importantes monoculturas da história brasileira e responsáveis pelo uso de grande extensão de terra, onde estava a Floresta Atlântica (MAGNANINI; MAGNANINI, 2002 ).

Até o século XVI, através da subdivisão da área costeira brasileira em capitânicas hereditárias, os grandes latifundiários proprietários de enormes extensões de terra, fizeram uso desenfreado da floresta e dos recursos oferecidos por ela, seja retirando madeira ou animais para diversos usos (DI PIETRO, 2006).

Em 1746 foram plantados os primeiros cacauzeiros (*Theobroma cacao*), na região da floresta ombrófila densa, na Fazenda Cubículo, as margens do Rio Pardo, atual município de Canavieiras (SAMBUICHI, 2003). O proprietário e responsável pela introdução foi o colonizador Antônio Dias Ribeiro que trouxe as sementes do Pará. Devido a necessidade de sombreamento dos cacauzeiros, as plantações eram feitas em áreas de floresta preservada, raleando o sub-bosque e, dessa forma, preservando as grandes árvores. Essa forma de plantio ficou conhecida como “cabruca”, palavra

derivada da expressão “vem cá brocar a mata” (MARTINI, 2002). Além da preservação das grandes árvores matrizes da floresta, a cabruca proporcionava a conectividade entre áreas de plantio e áreas de floresta, preservando o fluxo gênico de muitas espécies vegetais e animais (SAMBUICHI, 2006).

O sucesso da introdução cacauera na região atraiu muitos e promoveu um crescimento econômico local. Cidades como Ilhéus, Itabuna, Canavieiras e Belmonte produziam uma enorme quantidade de cacau de boa qualidade e exportava a mercadoria. Foram construídas estradas e vias e acesso entre fazendas, o porto de Ilhéus, o maior exportador de cacau do Brasil na época (ALENCAR, 1970)

O sul da Bahia ficou então conhecido como a região cacauera e atingiu o auge entre o final do século XIX e início do século XX. Os grandes produtores de cacau, conhecidos como coronéis do cacau, compravam suas patentes, não serviam carreira militar (SAMBUICHI, 2003).

Nessa época não se imaginavam haver algo capaz de atingir a produção cacauera da região. Porém em 1989 surgiu na região um fungo (*Moniliophthora perniciosa*) causador da doença conhecida como vassoura-de-bruxa, que gerou um grande impacto nas plantações da região. Com o declínio do cacau, a economia foi profundamente afetada, resultando numa produção anual quatro vezes menor. Assim, a sociedade profundamente dependente do cacau também sofreu com a crise e ocorreu migração das grandes fazendas para as cidades da região (ALVES, 2006).

A partir desse momento os produtores de cacau começaram a invadir suas cabucas em busca de grandes árvores madeiras e o que foi sombreamento das plantações passou a ser uma reserva de renda. Dessa forma a floresta ombrófila densa volta ao ciclo do desmatamento, perdendo árvores matrizes milenares, afetando todo o ecossistema da região (MAGNANINI; MAGNANINI, 2002). Além disso, a criação de áreas de pastagem favorece o processo de fragmentação das paisagens, subdividindo a floresta em fragmentos muitas vezes isolados uns dos outros. Os pastos também contribuem com a deficiência na qualidade do solo, com o stress hídrico da região, com o empobrecimento de espécies, com a descaracterização das áreas originais e com gases relacionados ao efeito estufa (ALMEIDA et al. 2011).

A década de 1970 marcou o início de um novo capítulo no uso da terra do sul da Bahia. A construção da rodovia BR 101, assim como outras demais rodovias, seguiu o Plano Nacional de Aviação, o PNV, desenvolvido pelo governo militar em 1964

(AMORIM; OLIVEIRA, 2007). O asfaltamento da BR 101 conectou com maior facilidade o sul da Bahia com o Sudeste do país, o escoamento da produção agropecuária progrediu, assim como a exploração madeireira. Neste mesma época, ocorre a supervalorização do eucalipto como matéria prima para celulose e grande extensão de floresta ombrófila densa do sul da Bahia dá lugar a monoculturas, impulsionado pelo Governo Federal (PEREIRA; LESSA, 2011). Dessa forma, a agricultura e pecuária tornam-se menos importantes do que a celulose e rapidamente os pomares e cabruças são substituídos por eucalipto (GONÇALVES, 2012; Figura 3).



Figura 3. Fisionomia de paisagem em Belmonte. Plantação de eucalipto (*Eucalyptus* sp.).  
Foto: Flora Bittencourt, 2012

Torna-se impossível distinguir o processo de viação brasileira com o histórico de produção e escoamento agropecuário (PEREIRA; LESSA, 2011). Empresas de celulose estabeleceram-se no estado, proporcionando discussão entre o desenvolvimento econômico da região e o impacto ambiental causado por extensas monoculturas de eucalipto nos quais estão inseridos fragmentos da floresta original (GONÇALVES, 2012).

Um dos grandes problemas decorrentes das extensas monoculturas está na fragmentação das florestas, o que leva ao aumento de área de borda e consequente mudança na estrutura e composição da comunidade original (ALVES JR et al. 2007). A borda da floresta é compreendida como a área de transição entre o habitat e o não-habitat e está sujeita aos efeitos da matriz do entorno do fragmento (METZGER et al.

2009). Aumento da luminosidade e da ventilação podem levar a um aumento na temperatura do ar e do solo, proporcionando maior evapotranspiração e, como consequência, diminuição da umidade relativa do ar e do solo, caracterizando estado de stress hídrico (PACIENCIA; PRADO, 2004). Dessa forma, espécies pioneiras geralmente apresentam maior dominância, pois suportam tais condições ambientais. A perda de diversidade de arbóreas nestes locais também poderá ser explicada pela ausência de espécies dispersoras de sementes, incapazes de sobreviver em áreas sem habitats específicos (SILVA; TABARELLI, 2003).

Martini em 2002, registrou diferenças marcantes entre as famílias de vegetais existentes entre clareiras, áreas queimadas, sub-bosque e áreas de floresta. Segundo a autora, as famílias com maior limite de tolerância ao stress hídrico existente em clareiras e áreas queimadas são Myrtaceae, Rubiaceae e Fabaceae.

Um fragmento de floresta muito pequeno poderá ser, na verdade, uma grande borda, capaz de agregar uma comunidade primária de espécies vegetais. A reestruturação desse ambiente dependerá da matriz que o circunda e, muitas vezes, atenderá aos preceitos do modelo de biogeografia de ilhas, proposto por McArthur; Wilson (1967).

A Teoria do equilíbrio da biogeografia de ilhas estabelece que o tamanho da ilha, assim como o grau de isolamento são fatores preponderantes no processo de colonização, extinção e recolonização por espécies. Em ilhas mais distantes, ou mais isoladas, a dispersão de muitas espécies é prejudicada, estando a sua ocorrência restrita a área ilhada. Da mesma forma, poderá não haver colonização por outros organismos (MACARTHUR; WILSON, 2001; OLIVEIRA; GOULART, 2008).

Faria et al. (2009) afirmam que uma variedade de distúrbios causados por atividades humanas resultaram na formação da paisagem variegada que observamos atualmente na região de Una, no sul da Bahia. Visitando alguns dos remanescentes florestais desta mesma região, percebe-se que são “ilhas” de floresta imersas em extensas áreas de pasto ou monoculturas. Outros fragmentos florestais, entretanto, encontram-se imersos em outros sistemas de cultivo menos homogêneos como sistemas agroflorestais (cabruca), seringais, coqueirais, entre outros (observação pessoal). Assim, investigações acerca do comportamento da comunidade existente nessas áreas tornam-se importantes para a compreensão da influência e da implantação de metodologias agropecuárias desenvolvidas de forma mais permeáveis à biodiversidade local (NASCIMENTO et al. 2012; SILVA; TABARELLI, 2000; VIANA; PINHEIRO, 1998).

Muitos autores defendem que a recuperação das áreas degradadas esteja intrinsecamente relacionada com a proteção dos remanescentes florestais, principalmente os núcleos dos fragmentos onde ainda encontram-se florestas maduras ou secundárias tardias (SILVA; TABARELLI, 2000; MARTINI et al. 2007; AYRES et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2004). Dessa forma, a continuidade das espécies características dependerá da criação de reservas legais de proteção à natureza e da expansão das áreas protegidas, mesmo que divididas em categorias de uso privado ou proibido e de corredores ecológicos entre fragmentos (AYRES et al. 2005).

A construção de corredores ecológicos pode ser uma saída estratégica para reestruturação da área de floresta original, interligando remanescentes florestais e proporcionando migração e fluxo gênico (SEOANE et al. 2010). A lei Federal nº 9.985/2000 estabelece o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza (SNUC) o qual conceitua corredores ecológicos como “porções de ecossistemas naturais ou seminaturais, ligando unidades de conservação, que possibilitam entre elas o fluxo de genes e o movimento da biota, facilitando a dispersão de espécies e a recolonização de áreas degradadas, bem como a manutenção de populações que demandam, para sua sobrevivência, áreas com extensão maior do que aquelas das unidades individuais”.

Porém esse tipo de corredor poderá facilitar a movimentação de espécies invasoras, a deriva de comunidades, impactos demográficos e genéticos (HERRERA, 2011). O mesmo autor discute que ao facilitar a movimentação de determinada espécie, poderá prejudicar a permanência de outra, como numa situação de predador-presa.

A publicação de levantamento de dados coletados, a ampliação das discussões e o real interesse na preservação das espécies são três fatores que precisam estar unidos nas iniciativas de conservação da floresta Atlântica. Existem muitos trabalhos científicos relevantes, que apontam estratégias para restauração e/ou conservação que precisam ser extrapolados do papel das dissertações para a aplicabilidade prática. Seja frente a organizações de apoio, a grupos políticos interessados ou as próprias comunidades existentes próximas a Floresta Atlântica, o conhecimento gerado por todo o país nas instituições de pesquisa precisa ser aplicado, para que o ideal de conservação seja alcançado.

De acordo com o Decreto nº 750, de 10 de fevereiro de 1993, que dispõe sobre o corte, a exploração e a supressão de vegetação primária ou nos estágios avançado e médio de regeneração da Floresta Atlântica, e outras providências, a exploração da Floresta Atlântica será autorizada se obedecer aos requisitos de proteção da

biodiversidade. Designação de área de retirada máxima anual, parcelamento de solos respeitando as determinações do decreto, a preservação de áreas com abrigo para espécies em extinção e controle da erosão são algumas medidas previstas que devem ser respeitadas e fiscalizadas.

Em 22 de dezembro de 2006, houve incisos vetados pelo então presidente da república, justificados pelas decisões tomadas na Decisão VI/9 da COP-6 da Convenção da Diversidade Biológica, a qual estabeleceu estratégias para a conservação da flora, dentre elas, a conservação de pelo menos 10% das regiões ecológicas do mundo, delimitação limítrofe para a situação atual da Floresta Atlântica. Posteriormente, na 7ª Conferência Mundial sobre Diversidade Biológica (COP-7), o comprometimento dos países signatários como o Brasil frente a redução de extinções de espécies levou a novos vetos no Decreto nº 750 (1993), devido a contradições entre o texto e as novas metas federais (LEI 11.428/2006 (LEI ORDINÁRIA) 22/12/2006). Os encarregados da fiscalização são o IBAMA e o Conselho Estadual do Meio Ambiente.

#### **4. FAMÍLIA MYRISTICACEAE**

Myristicaceae está classificada como uma das famílias mais primitivas das Angiospermas vivas, devido às características gerais das espécies (RODRIGUES, 1980). Segundo Takhtajan (1980) as famílias Canellaceae, Annonaceae e Myristicaceae foram especializações de um mesmo ancestral comum. As mesmas conclusões foram descritas por Armstrong e Wilson, (1980).

Acredita-se que a conquista de habitats geograficamente distantes deve ter acontecido antes da divisão continental, provavelmente depois do período cretáceo (ARMSTRONG; WILSON, 1978). Portanto, no passado havia uma distribuição contínua dos representantes da família, propagados nas regiões neotropicais do globo (SAUQUET, 2003). Assim, os gêneros evoluíram a partir de um ancestral comum e sofreram mutações capazes de gerar grupos fitogeográficos distintos devido às barreiras geográficas e ecológicas. (ARMSTRONG; TUCKER, 1986; SAUQUET, 2003).

Warb foi o único monografista que emitiu conceitos básicos e até hoje aceitos sobre o trabalho taxonômico da família inteira, esclarecendo e restaurando

definitivamente o gênero virola, reduzido à simples seção do único gênero adotado por eles na época, Myristica (RODRIGUES, 1980).

A família Myristicaceae agrega cerca de 20 gêneros e 500 espécies: nove gêneros ocorrem nas Américas (Guatemala e Antilhas até Bolívia e Brasil e Costa ocidental da Colômbia e Equador até a costa do Atlântico, no Brasil), quatro gêneros na Ásia (Ásia tropical da Índia à Polinésia), sete gêneros na África e em Madagascar (SAUQUET, 2003). A mesma autora sugere que a monodelfia dos estames ocorre independentemente na família, assim como a unissexualidade da maioria dos gêneros. Essa última característica confere um caráter evolutivo mais derivado na família.

A família Myristicaceae geralmente apresenta infrutescência pedunculada, na axila da folha, desenvolvendo pedicelo herbáceo, amarelo esverdeado, opaco, com tricomas simples (CARA, 2006). Os frutos podem ser subglobosos ou oblongos, essencialmente carenados ou lisos, com pericarpo variante de fino a espesso e lenhoso, com arilo ou sarcotesta coloridos e brilhantes e mesocarpo relativamente carnoso e rico em lipídios (CARDOSO, 1994; GURGEL et al. 2006). Tem mesocarpo coriáceo, castanho, com 2,52mm de espessura (GURGEL et al. 2006). Sua placentação é basal, livre, monospermico (RODRIGUES, 1980). A dispersão de sementes é zoocórica (LENZA; OLIVEIRA, 2006; GALETT et al. 2000; HOWE, 1981; RUSSO; AUGSPURGER, 2004; HOWE; KERCKHOVE, 1981).

As sementes dos gêneros em geral apresentam restrições para dispersão a longa distância, pois o tamanho impede seu transporte pelas aves, por exemplo. O peso da semente impede a flutuação, assim como a testa não protege contra a ação da água salgada, além do embrião ser perecível (ARMSTRONG; TUCKER, 1986).

Há liberação de forte odor pelas flores independentemente do gênero, provavelmente como atração de agentes polinizadores. Essa característica é comum na família Myristicaceae, contribuindo para conclusões acerca do mimetismo realizado pelas flores produzidas pelas espécies da família (LENZA; OLIVEIRA, 2006).

Rochelle et al. (2011) desenvolveram estudo florístico e estrutural de Floresta Atlântica localizada no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, e afirmam encontrar entre as árvores mais altas do dossel, as Myristicaceae *Virolabicuhyba* e *Virola gardneri*. Neste estudo, a família Myristicaceae está entre as famílias mais abundantes, com 43 representantes.

Silva e Silva (2008) em investigação florística do município de Presidente Figueiredo (Amazonas), afirmam que a família Myristicaceae apresentou maior



diversidade de gêneros e espécies, totalizando no estudo 23 espécies e duas variedades, sendo o gênero *Virola* correspondente a 10 espécies e as duas variedades. Das coletas realizadas, 53 corresponderam a espécies de *Virola*.

#### 4.1 GÊNERO VIROLA

O gênero possui nomenclatura popular diferenciada a depender da região, sendo chamada de ucuuba na Amazônia, bicuíba no Nordeste e virola no Sul do Brasil e no comércio madeireiro. Possui cerca de 35 espécies descritas no mundo (RODRIGUES, 1980). O mesmo autor afirma que a sua ocorrência é registrada em áreas com alta luminosidade como clareiras, capoeiras ou áreas de trilhas abertas e matas de galeria. Consegue alcançar rapidamente tamanho suficiente para ultrapassar o dossel de árvores mais antigas.

É observado nas três maiores zonas florísticas do Brasil: hileia amazônica, florestas costeiras e cerrados. Interessante perceber que as espécies existentes na bacia amazônica não são as mesmas registradas na Floresta Ombrófila Densa da Floresta Atlântica (PAULA; SOARES, 2011; LORENZI, 1949; RODRIGUES, 2002; ROCHELLE et al. 2011). Provavelmente essa distribuição se dá devido a diferenças climáticas entre as regiões brasileiras e algumas espécies são classificadas como raras ou endêmicas (RODRIGUES, 1980). Porém a maior parte das espécies conhecidas está na bacia amazônica. No sul do Brasil, em Santa Catarina, observa-se apenas uma espécie de *Virola*, a *V. oleifera* Smith (LORENZI, 1949). Diversos estudos realizados afirmam a ocorrência de 2 a 19 indivíduos por hectare de diferentes espécies de *Virola* (PRATA et al. 2011; ROCHELLE et al. 2011; PAULA; SOARES, 2011).

Cardoso (1994) e Mariano (2004) classifica as espécies do gênero *Virola* como pioneiras, por recrutar em local com muita luminosidade. Contradizendo este autor Rodrigues (1980) e Jahnel (2008) afirmam que *Virola oleifera* ocorre no estágio clímax de sucessão. Paula e Soares (2011) e Pessoa et al. (2011) classificam as *Virolas* como secundárias tardias. Dessa forma, observa-se uma contradição entre a classificação do gênero como secundária inicial, intermediária ou tardia.

De forma geral, as espécies de *virolas* são plantas heliófitas, lenhosas e dioicas (RODRIGUES, 1980; GURGEL et al. 2006; LENZA; OLIVEIRA, 2006) São perenefolias, com ramificação verticilada e plagiotrópica, podendo apresentar sapopemas ou raízes-escoras (JARDIM; MOTA, 2007). Algumas espécies são

arbustivas, outras crescem atingindo rapidamente o dossel com suas longas folhas, chegando a apresentar 40 metros de altura e 120 cm de DAP (LORENZI, 1949).

O tronco da bicuiba é monopodial ortotrópico, com camadas de crescimento pouco definidas. Apresenta grande valor comercial para suas toras brutas, pois não sofre deformações quando cortadas em ripas (CARVALHO, 2003). Quando não são devidamente tratadas, não resistem a pragas (principalmente insetos xilófagos) e ao apodrecimento dentro da água. Apresenta densidade  $0,61\text{g/cm}^3$ , sendo considerada como moderadamente pesada, com superfícies lisa ao tato (RIZZINI, 1971).

Sua casca é fina e ao descascar ou perfurar libera exsudato travoso, de cor castanho-avermelhado já que sofre oxidação em contato com o ar. Os vasos podem ser solitários, geminados (maioria das espécies), múltiplos e agrupados, de forma circular, oval ou ovóide, de parede espessa, muito pequenos a médios, pouco ou muito numerosos (até 15-18 por  $\text{mm}^2$ ) (RICHTER et al. 2006).

A madeira é utilizada para construção naval, pode ser utilizada na fabricação de compensados e para papel tipo Kraft de boa qualidade (CARVALHO, 2003). O mesmo autor complementa seu uso também na construção civil, carpintaria e marcenaria, confecção de esteios, contraplacados, miolo de portas, molduras e rodapés.

A árvore poderá ser utilizada no paisagismo de parque e jardins, pois se desenvolve bem em ambientes de muita luminosidade. Seus frutos são procurados por aves e outros animais (GALLET et al. 2000), podendo então ser implantadas em áreas de recuperação florestal (LORENZI, 1949).

*Virola officinalis* apresenta tricomas por toda a planta, em todos os estágios do desenvolvimento, com diferentes características e durabilidade quando comparada com outras espécies do gênero (RODRIGUES, 1980). As folhas são dísticas, simples, alternas de margem inteira, de forma oblonga ou elíptica São pecioladas, com ápice frequentemente acuminado ou cuspidado. Podem alcançar 50 cm de comprimento. (RODRIGUES, 1980; MORAES; DOMINGOS, 1997). As nervuras secundárias são abundantes no gênero, assim como as nervuras terciárias reticuladas paralelas, impressas na face axial. A disposição das nervuras e o tipo de tricoma são capazes de diferenciar as espécies. A pubescência ocorre na face abaxial das folhas de virola (RODRIGUES, 2002).

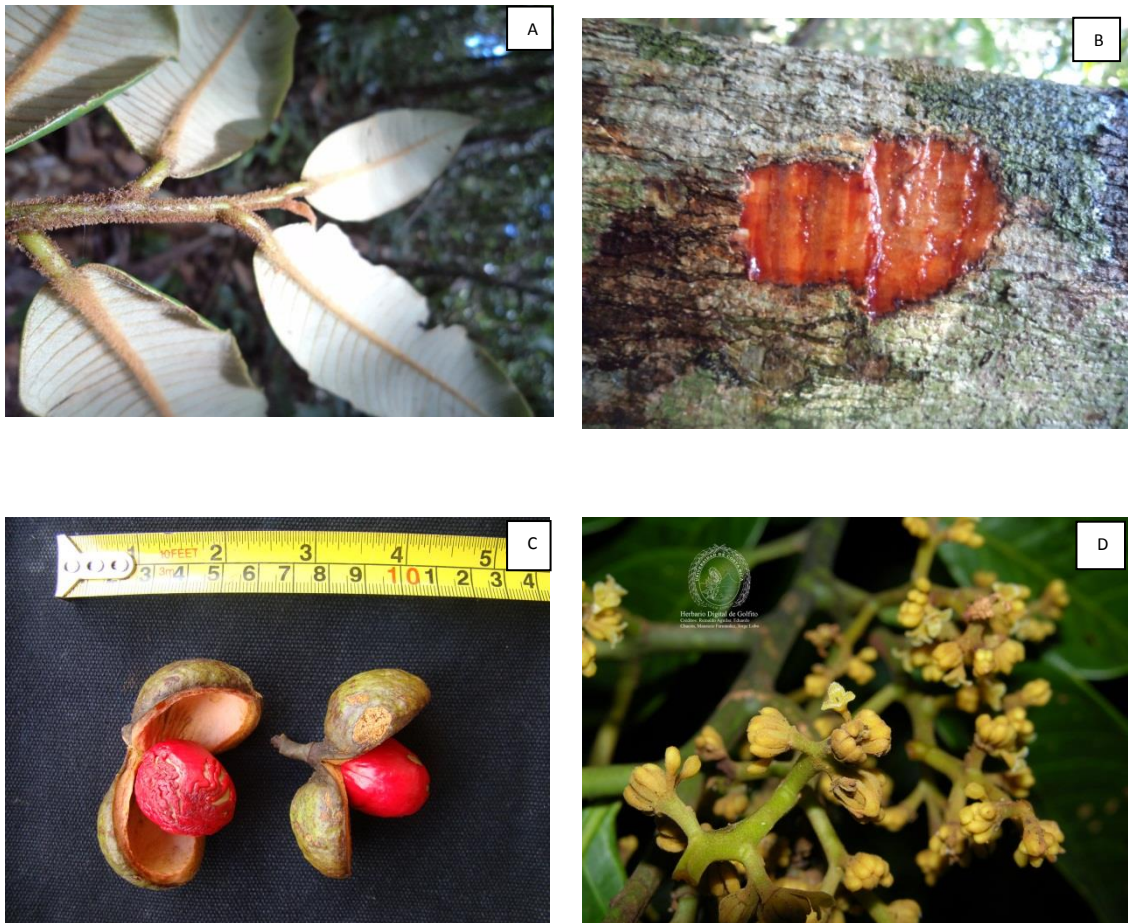


Figura 4. *Virola officinalis*. A – ramo foliar, detalhe dos tricomas. Foto: Flora Bittencourt, 2012. B – corte do caule. Foto: Flora Bittencourt, 2012. C – fruto. Foto: Letícia Ferraço, 2011. D – inflorescência. Foto: Herbário Digital de Golfito.

A maioria das espécies é perenefolia ou semidecídua, sendo verificada a mudança foliar antes do início da floração. Algumas espécies como *V. gardneri* não possui fitofases muito bem definidas e sua frutificação é observada em quase todo o ano (COUTO-SANTOS, 2007).

Para espécies amazônicas, verifica-se a coincidência da floração com a estação estival e a frutificação com o período de chuvas. Para espécies extra-amazônicas, a floração parece coincidir com o verão e a frutificação com o inverno (RODRIGUES, 1980). Os fascículos florais masculinos estão dispostos distalmente na inflorescência são muito variáveis em número de flores, podendo ocorrer até 100 flores em cada um deles, como registrado em *V. multiflora* (LORENZI, 1949; PRATA et al. 2011). As brácteas são sempre decíduas e as bractéolas serão sempre ausentes (JARDIM; MOTA, 2007).

Nas espécies do gênero *Virola*, apesar de gerar inflorescências femininas menores, subterminais ou axilares, as flores femininas serão maiores do que a do sexo oposto (PRATA et al. 2001). Essa semelhança favorece a polinização, já que mesmo as flores masculinas são visitadas pelos agentes polinizadores, um caso típico de automimetismo floral (LENZA; OLIVEIRA, 2006; CARDOSO et al. 1994). Essa poderá ser uma estratégia para atrair polinizadores a certa distancia da planta, por um período maior.

O pólen seria como recompensa para polinizadores, porém não há recursos para agentes visitantes nas flores femininas. Não foi observada a disponibilidade de néctar ou exsudados nas flores da *V. sebifera* (LENZA; OLIVEIRA, 2006). Os mesmos autores afirmam que mesmo parcialmente abertas as flores femininas e masculinas apresentavam-se funcionais, ou seja, ovários receptivos e liberação de pólen. O ovário é sésstil, monocarpelar, densamente tomentoso e com um único óvulo basal. Tem estilete muito curto ou nulo e o estigma é geralmente bífido. A polinização é realizada principalmente por besouros (CARDOSO et al. 1994; LENZA; OLIVEIRA, 2006), síndrome classificada como cantarofilia por Faegri e Van Der Pijl (1966).

Diferente dos autores supracitados, Jardim e Mota (2007) observaram um grau de especificidade entre representantes de Myristicaceae e os polinizadores *Copestylum* sp e *Erystalys* sp Segundo esses autores, a floração masculina é exclusivamente doadora de pólen, apresentando abundância e curta longevidade em relação a feminina. Nestas, o investimento é voltado para fertilização, existindo menor quantidade, porém maior longevidade das flores. Estes autores sugerem que o gênero *Virola* é efetivamente polinizado por dípteros, existindo possível co-evolução entre dípteros e Myristicaceae. Thien et al. (2009) explicam que os dípteros podem ter sido os primeiros polinizadores para as angiospermas, com alcance de vôo variando entre 50 a 800 metros de distância a depender da espécie (ACHEE et al. 2007). Lenza e Oliveira (2006) também observaram dípteros como visitantes das flores de *Virola sebifera* e discutem que apenas pequenos insetos poderiam entrar no cálice das flores, independente do sexo.

Rodrigues (1980) descreveu a inflorescência da *Virola officinalis* do tipo panícula, ferrugínea, levemente zigomorfa, com flores infundibuliformes (com estruturas reprodutivas inclusas), apétalas, com 3 ou 4 sépalas, pilosas e soldadas entre si, coloração amarela. As masculinas apresentam aproximadamente 3 mm de comprimento, com 6 a 8 estames, concrecidos em uma coluna central no interior da flor. As anteras são alongadas, com deiscência longitudinal. As flores femininas tem

aproximadamente 4 mm e possuem ovário unilocular, súpero, globoso e piloso. Tem estigma bilobado, com coloração esverdeada quando está receptivo (JARDIM; MOTA, 2007).

As flores permanecem abertas durante todo o tempo de floração (antese diurna e noturna), favorecendo a visita de agentes polinizadores repetidas vezes (GURGEL et al. 2006; SAUQUET, 2003).

As sementes de *Virola surinamensis* possuem alto valor econômico, pois contém os seguintes ácidos graxos saturados: cáprico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico e insaturados: oleico, linoleico (AGURELL et al. 1969). Os mesmos autores afirmam que as sementes também possuem um triglicérido chamado trimiristina utilizado no preparo de cremes e outros produtos farmacêuticos. Esses componentes conferem maciez e suavidade nas fórmulas de perfumaria e cosméticos (MORAES; DOMINGOS, 1997; HOLMSTED et al. 1980). São empregados também na confecção de velas e na saboaria.

Depois de processadas, as sementes do gênero geram um resíduo gorduroso que pode ser empregado na alimentação do gado, pois contém alto valor nutritivo e do componente químico nitrogênio (GURGEL et al. 2006). Agurrel et al. (1969) investigaram a utilização das amêndoas de *V. gardneri* no tratamento contra germes grã-positivos e germes ácido-resistentes, observando sucesso no procedimento testado. Barata e Baker (1973), assim como Lopes et al. (1998) afirmam ação protetora do extrato hexânico das folhas de *Virola surinamensis* contra a infecção de *Schistosoma mansoni*. Além disso, a espécie apresenta outros compostos anti-mitóticos. Lopes et al. (1999) investigaram o poder inibidor do vapor do óleo extraído de folhas adultas de *Virola surinamensis* contra o desenvolvimento do protozoário da malária se iniciado o tratamento em até 48 horas após a contaminação. Barata et al. (2000) mostraram o sucesso de duas espécies de *Virola* (*V. surinamensis* e *V. pavonis*) na ação contra leishmaniose.

Quando estudadas quimicamente a resina, as folhas, as cascas e as raízes de *Virola surinamensis* apresentaram derivados triptamínicos (N-metiltriptaminas, triptamina, N-dimetiltriptamina, 5-metoxi-N) empregados no preparo de rapé alucinógeno (HOLMSTEDT et al. 1980).

Em investigação realizada com espécies da Floresta Ombrófila Densa, Moraes e Domingos (1997) afirmam encontrar altas concentrações de nitrogênio em todas as amostras foliares, incluindo em amostras de *Virola oleifera*. No mesmo estudo, quando

comparadas com amostras coletadas em áreas de restinga, verificou-se maior concentração de Al, Mn, K e N nas folhas da Floresta Ombrófila Densa. Os resultados observados para o valor de Ca, Mg e K, sugerem que o solo da Floresta Ombrófila Densa onde as amostras foram coletadas é moderadamente fértil, já que florestas produtivas são ricas em P, K e Ca, por ciclar grandes quantidades de nutrientes.

A semente de *Virola officinalis* possui testa lisa, fina e quebradiça e um endosperma ruminado. O embrião é perecível, constituído por endosperma subereto livre (RODRIGUES, 1980). Considerando o gênero, a germinação é criptocotilar, epígea, dicotiledonar, com os cotilédones peciolados bem acima do solo, envolvidos pelo endosperma até o seu desprendimento, os quais separam o hipocótilo do epicótilo, folhas primárias (eófilas), pecioladas, supracotiledonadas, simples, alternas, conduplicadas, exestipuladas, peninérveas, inteiras, ferrugíneo-tomentosas ou glabrescentes (GURGEL et al. 2006).

A semente está totalmente, ou pelo menos metade, envolvida por arilo vermelho e laciniado. É formada por duas camadas de tegumento na *Virola officinalis* (RODRIGUES, 1980), a testa fina, mais externa, opaca, glabra e castanha. Apresenta região hilar basal, hilo orbicular, homocrômico, rafe linear, castanho. Internamente, apresenta cotilédones e eixo embrionários reduzidos, com plúmula imperceptível. O fruto é simples, unilocular, monospermo e carnosos, abrindo-se como um folículo, em duas valvas (GURGEL et al. 2006; CARDOSO et al. 1994). O pólen tem formato triangular, com arestas arredondadas. Pode variar entre 22 e 27,5 µm de comprimento ou diâmetro e são muito semelhantes interespecificamente (FLORIANO, 2004; JAHNEL, 2008).

Gallet et al. (2000) afirmam que entre os frutos consumidos por tucanos estão os frutos das espécies do gênero *Virola*, sendo que na investigação pelo autor apresentada, observou-se que 38,5% de todo o recurso alimentar dos tucanos foi representado pela espécie *Virola oleifera*. Barreto (2007) descreve o uso da *V. gardneri* como fonte nutricional pela preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*), sendo uma das árvores mais utilizadas pelo mamífero estudado. Russo (2003) discute a dispersão de sementes de *Virola calophylla* e encontra dezessete aves dispersoras no Parque Nacional Manffl, Peru. O mesmo autor registra o macaco-aranha (*Ateles paniscus*) como principal dispersor da espécie no local estudado.

Segundo Floriano (2004), pode-se quebrar a dormência de sementes de *V. gardneri* escarificando-a em meio úmido (190g de vermiculita/500mL de água/25 sementes) a 10°C, por 60 dias, porém esse procedimento não é sempre necessário.

Para o plantio deve-se colher os frutos quando iniciar a abertura espontânea. Coloca-los ao sol para completar a abertura e a liberação das sementes (CARDOSO et al. 1994). Não há necessidade de remover o arilo existente, apenas semear as sementes em recipientes individualmente, em substrato organo-argiloso e mantido em ambiente semi-sombreado. A emergência ocorre entre 30 e 50 dias, com baixa germinação (FLORIANO, 2004). Não há registro de formação de banco de sementes ou banco de plântulas no gênero. Um quilograma de semente contém aproximadamente 450 unidades (LORENZI, 1949).

O indivíduo depois de recrutado alcança o estado plântula aos 60 dias após a germinação, apresentando raiz primária longa, glabra, parda, com ápice amarelado e muitas raízes secundárias. O primeiro par de folhas é alterno, com tricomas (CARDOSO et al. 1994). Sua germinação foi classificada pelos autores como epígea, com emergência reta e ocorre na faixa de temperatura 20-30°C (GURGEL et al. 2006; CARDOSO et al. 1994).

São classificadas como espécies multiusos aquelas que possibilitam utilidades diferenciadas, seja na produção de matéria prima para manufaturados ou no emprego da espécie em diferentes situações de interesse econômico/ecológico/social. (OLIVEIRA-JUNIOR; CABREIRA, 2011). Os autores classificam a *Virola gardneri* como sendo útil para construções, energia, medicamentos e alimentícia, segundo conhecimento popular.

Foram encontradas apenas duas referências sobre investigações realizadas com a espécie *Virola officinalis*: Rodrigues (1980) e Barreto (2007). Por ser espécie endêmica da Floresta Ombrófila Densa, com ocorrência restrita do sul da Bahia pode ter sido apenas identificada e descrita, porém nunca antes estudada (RODRIGUES, 2002). Diante disso, a relevância desse e de outros estudos sobre a espécie tornam-se de extrema importância, contribuindo com dados para o conhecimento essa Myristicaceae e suas interações.

## 5. MICROSSATÉLITES E ESTRUTURA GENÉTICA

A genética da conservação pode ser entendida como o estudo de padrões genéticos ou processos que indiquem a necessidade de esforços para conservação (AVISE, 2010). Os desafios para desenvolvimento desse tipo de pesquisa vão desde a delimitação de uma escala física e temporal até a interdisciplinaridade das discussões acerca dos resultados, atentando às limitações analíticas da relação entre paisagem e dados genéticos das espécies estudadas. (BALKENHOL et al. 2009).

Estudos acerca do fluxo gênico poderão elucidar as condicionantes genéticas para manutenção, colonização de manchas e comunicação em geral das populações nos remanescentes que compõem uma paisagem (BIZOUX et al. 2009; ENGLAND et al. 2002).

Em isolados florestais a combinação do contexto de paisagem com as características fisiológicas e históricas da população poderá contribuir para perda de diversidade genética, pois quando a comunicação entre fragmentos está comprometida, a movimentação da fauna de médio e grande porte estará limitada, dificultando o fluxo gênico entre árvores distantes (MARTINS et al. 2008). Dessa forma, a falta de conectividade entre fragmentos poderá colaborar para a diminuição da diversidade genética em espécies arbóreas (BIZOUX et al. 2009).

Os alelos existentes nas árvores adultas serão herdados pelos propágulos da nova geração, dessa forma, uma maior diversidade alélica dos indivíduos adultos resultará na manutenção da diversidade alélica dos indivíduos jovens, favorecendo a recuperação da espécie em áreas impactadas (MARTINS et al. 2008).

Logo após eventos de fragmentação e perda de habitat, populações inteiras poderão deixar de existir ou diminuir muito, prejudicando o *pool* gênico de determinada espécie na paisagem (ENGLAND et al. 2002). A população poderá sofrer efeito gargalo considerando o isolamento das manchas de habitat e da própria redução dos indivíduos na paisagem, influenciando processos reprodutivos, evolutivos, sistemas de acasalamento e de fluxo gênico, além de potencialmente provocar deriva genética nas gerações subsequentes (BITTENCOURT; SEBBENN, 2009).

A perda de diversidade genética nem sempre é bem percebida em populações arbóreas, pois os indivíduos adultos poderão estar no ambiente há muitos anos, refletindo uma característica ambiental antepassada, dificultando a avaliação da deriva



genética (DUBREUIL et al. 2010). Dessa forma, espécies arbóreas são consideradas como relativamente resistentes à fragmentação do habitat por causa da sua longevidade e produção de banco de plântulas ou de sementes (ENGLAND et al. 2002). No entanto a resposta de cada espécie para perda de habitat pode variar muito, dependendo dos seus atributos biológicos, em particular, a capacidade de dispersão de sementes.

De acordo com Bacles e Jump (2010), o paradoxo da genética da fragmentação florestal indica que durante o processo de fragmentação, a perda genética ocorrida com a diminuição da população irá depender do nível de redução da população original. Além disso, a forma como é dispersada e polinizada também será somada aos efeitos de perda de habitat, assim como características de crescimento espaço-temporal da espécie, sistemas de reprodução e distribuição agregada ou não dos indivíduos na população.

Para espécies anemocóricas, por exemplo, a fragmentação poderá não interferir diretamente na dispersão, porém a consequente perda de habitat reduzirá a probabilidade do recrutamento de novos indivíduos na paisagem (DUBREUIL et al. 2010). A variabilidade genética estará restrita aos remanescentes florestais, contendo indivíduos sobreviventes ao processo de fragmentação, perda de habitat e/ou corte e, dessa forma, a contribuição para a próxima geração poderá estar comprometida, podendo ocorrer estruturação genética das diferentes e isoladas populações existentes nas manchas de habitat em uma determinada paisagem.

A estrutura genética pode ser entendida como a distribuição homogênea dos alelos e genótipos no ambiente, de forma a aproximar geneticamente os indivíduos de uma determinada população (FARIAS, 2010). Forças evolutivas como mutação, migração, seleção e deriva genética interferem potencialmente nessa condição e a sua dinâmica pode ser alterada através de ações antropicas e naturais. Tais forças poderão criar grupos divergentes dentro das populações (SMULDERS et al. 2001).

O número de alelos por loco, a heterozigosidade esperada e observada são parâmetros que quantificam a variabilidade genética nas espécies. A caracterização da estrutura genética entre populações poderá ser testada de acordo com a análise da diversidade gênica em populações subdivididas (NEI, 1977), utilizando os cálculos das estatísticas  $F$  de Wright (WRIGHT, 1965), a partir das estimativas de  $F_{ST}$ , a endogamia da população em mancha de habitat ( $F_{IS}$ ) e a endogamia total da paisagem ( $F_{IT}$ ). O coeficiente de coancestralidade de Cockerham ( $\Theta$ ) possibilita estimativa de endogamia e avaliação da divergência gênica em diferentes níveis de hierarquia (COCKERHAM, 1969).

De acordo com o sistema de reprodução, a estrutura genética poderá ser algo esperado, como por exemplo em que se reproduzem predominantemente através de autofecundações. Nestas as futuras gerações poderão estar em Equilíbrio de Wright. Entretanto, nas espécies que se reproduzem predominantemente por cruzamentos, há uma expectativa de cruzamentos aleatórios na população e caso esta população seja suficientemente grande pode-se esperar a aderência das proporções genotípicas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (LOVELESS; HAMRICK, 1984; FARIAS, 2010; KAGEYAMA; CASTRO, 1989). A maioria das espécies vegetais (90%), apresenta hermafroditismo com sistema sexual (CHARLESWORTH; 2002) e existe uma predominância para o sistema de cruzamentos (GOODWILLIE; KALISZ; ECKERT, 2005).

Além do sistema de reprodução, a forma como ocorre a migração e o encontro entre indivíduos de diferentes populações também poderá contribuir para o pool gênico da espécie. No modelo de alpodras (*stepping-stone*), por exemplo, cada fragmento recebe visitantes vindos somente de populações vizinhas. Assim, espera-se que populações existentes em locais mais afastados apresentem correlações gradualmente menores do que aquelas mais próximas entre si (HUSBAND; BARRET, 1996; KIMURA; WEISS, 1964). Os marcadores moleculares são capazes de fornecer muitas informações sobre a realidade genética de uma população, contribuindo para medidas de conservação, relações filogenéticas entre táxons e melhoramento, por exemplo (AVISE, 2010). Têm o poder de avaliar a dispersão de genes de duas maneiras: as abordagens indiretas, tais como comparações de frequências alélicas entre populações ou na reconstrução de árvores genealógicas. A abordagem direta de parâmetros de dispersão utiliza a análise de paternidade em eventos recentes de dispersão (BROQUET; PETIT, 2009).

Dentre os marcadores moleculares já desenvolvidos, destaca-se os codominantes e polimórficos marcadores microssatélites como melhor indicados para investigações sobre variabilidade genética, cálculos de frequência alélica, desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, identificação e discriminação de genótipos e testes de paternidade (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; RISTERUCCI et al. 2005).

Microssatélites são caracterizados como pequenas sequências repetitivas, cerca de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, apesar de não existir um número definitivo de repetições (BORÉM; CAIXETA, 2009; ENGLAND et al. 2002; MAGUIRE et al. 2001; NYBOM, 2004). Esse tipo de marcador é classificado como

instável no genoma, capaz de gerar locos polimórficos, interessantes no estudo de populações (ZUCCHI, 2002).

As sequências que flanqueiam os microssatélites geralmente são conservadas entre indivíduos da mesma espécie, permitindo o desenvolvimento de pares de *primers* espécie-específicos (VALLE et al. 2011; SMULDERS et al. 2001). Dessa forma, é possível amplificar fragmentos contendo o microssatélite através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Assim, além de agregar a rapidez da tecnologia de PCR necessitando assim de pouco DNA disponível, cada loco microssatélite é altamente variável e de grande conteúdo informativo resultando numa ferramenta eficiente para estudos genéticos em eucariotos (BORÉM; CAIXETA, 2009; RISTERUCCI et al. 2005).

A quantidade de nucleotídeos no elemento repetitivo é inversamente proporcional a sua frequência no genoma (BORÉM; CAIXETA, 2009). O desenvolvimento dos *primers* microssatélite especificamente corresponde a uma limitação da técnica, já que para cada espécie (ou gênero, caso ocorra a transferência entre espécies) se faz necessário o seu isolamento e desenvolvimento (MAGUIRE et al. 2001).

A variação na frequência de microssatélites poder ser diferente entre espécies e subespécies, assim como para diferentes classes desse tipo de marcador (SMULDERS et al. 2001). A diversidade alélica também é resultado de fenômenos complexos, como substituições e inserções/deleções nas regiões flanqueadoras dos microssatélites ou ainda nas repetições características do próprio marcador molecular (BORÉM; CAIXETA, 2009). Dessa forma, percebemos que a frequência genômica varia entre espécies de acordo com o número absoluto de microssatélites existentes quanto na preferência de repetição.

Uma das premissas para investigações sobre genética de populações é a utilização de marcadores neutros, isto é, aqueles que não sofrem pressão de seleção (BUEHLER et al. 2013). Assim, para realizar análises utilizando ferramentas moleculares microssatélites é importante averiguar a neutralidade deste marcador. Porém a identificação desses marcadores nem sempre é possível e a inclusão de locos no estudo poderá ocasionar desvios nos resultados analisados. Para espécies não-modelos, as quais muitas características e comportamentos são desconhecidos, a busca por *outliers* torna-se importante para entender processos de especiação (GUICHOUX et al. 2013).

Ecótipos poderão acumular diferenças genéticas com o passar do tempo a depender das características reprodutivas e de dispersão, relacionados a adaptação ao ambiente ao qual estão inseridos (LOVELESS, M.; HAMRICK, 1984). Os locos caracterizados para investigações não deverão estar conectados ou inseridos a regiões codificantes, deverão ser neutros. Isso evita encontrar dados falsos, relacionados a condições ambientais ou ecológicas e não à variável investigada no estudo (BUEHLER, 2013).

Para conservação das espécies arbóreas existentes nos remanescentes florestais resultante da fragmentação e perda de habitat, investigar a estrutura genética torna-se um importante instrumento de avaliação de viabilidade e aptidão, afinal o processo de fragmentação poderá resultar em diferentes e complexas consequências para a estrutura genética de plantas (APARICIO et al, 2011). Atenção deverá ser concedida quando os valores dos dados analisados representarem a estruturação genética de espécies alógamas, significando um déficit de fluxo gênico e da dispersão de sementes da espécie, podendo levar a depressão da diversidade alélica e combinações de alelos deletérios recessivos, revelando situação antagônica entre a diminuição do valor adaptativo e o aumento do comprometimento da população investigada (ZUCCHI, 2002).



# Capítulo 1

**DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS FOR *Virola officinalis* Warb. (Myristicaceae), AN ENDEMIC TREE OF THE BRAZILIAN ATLANTIC RAIN FOREST BY NEXT GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGY**

Flora Bittencourt<sup>1</sup>, Roberto Tarazi<sup>1</sup>, and Fernanda A. Gaiotto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Markers, Center of Biotechnology and Genetics (CBG), State University of Santa Cruz (UESC), Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 16 s/n, Salobrinho, 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brazil.

<sup>2</sup>Corresponding author: gaiotto@uesc.br

**ABSTRACT**

We report the development and characterization of microsatellite markers for *Virola officinalis*, an endemic southern Bahia Atlantic rain forest tree and important food resource for local wildlife. Twenty-four individuals were collected to characterize the 21 primers developed by next generation sequencing. Of the 21 primers studied, 15 were polymorphic. On average, the expected heterozygosity per population ranged from 0.64 to 0.73. The combined probability of exclusion was higher than 0.999, indicating that the microsatellite markers developed are suitable for genetic structure investigations and paternity testing. Our results will contribute to the design of efficient conservation strategies not only for this species, but for the Atlantic rain forest as a whole.

**Keywords:** NGS; primer, conservation genetics, endangered species.

*Virola officinalis* Warb. (Myristicaceae) is an endemic woody tree from the Atlantic rain forest (Rodrigues 1980). Its fruits are sought by large birds other endemic and endangered animals who use it as a food resource and act as seed dispersers. The arboreal species of the Atlantic rain forest are now threatened with extinction because of habitat reduction, selective logging, and defaunation (Martini 2007). Diversity studies of species populations are useful in assessing the effects of human activities on ecosystems and planning conservation strategies. Taking this into consideration, we developed 21 microsatellite markers for *V. officinalis* using an enrichment genomic library with the probes (AC)<sub>n</sub> and (AG)<sub>n</sub> and ultrafast, large scale next-generation sequencing (454 pyrosequencing technology, Ecogenics GmbH, Schlieren,

Switzerland). This sequencing tool is useful for elucidating the molecular genetic structure and evolutionary potential of target species (Ekblom and Galindo 2011).

The enriched genomic library was constructed with DNA from young, fresh leaves from a single *V. officinalis* individual located in the Privete Reserve, Nova Angelica (15°14'53"S, 39°4'45"W). A total of 172 sequences were generated between 82-218 bp. Of these, 15.11% had microsatellites. Twenty-four pairs of primers were designed, three of these did not produce amplicons and were excluded from the study. The remaining 21 pairs of primers exhibited patterns of amplification relevant to the expected fragment sizes, but only 15 were polymorphic.

The annealing temperature ranged from 52°C to 60°C (Table 1). For PCR, we prepared a mix containing (13 µl) 7.5 ng of genomic DNA, 1.3 µl of 10× buffer, 3.25 mM of each dNTP, 3.6 mg of BSA, 20 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1U of Taq DNA polymerase (Phonutria, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), 3.9 mM reverse primer mixed with the forward primer and M13 tail (CACGACGTTGTAAAACGA), and 1.43 mM primer complementary tail labeled with fluorochrome (6 -FAM, VIC, PET, or NED, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The amplification reaction was carried out in a Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) under the following conditions: an initial melting step at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles each at 94°C for 45 s, Ta (52 to 60°C) for 45 s, 72°C for 1 min, 8 cycles, each at 72°C for 1 min, 53°C for 1 min, and 72°C, 1 min. A final extension step at 72°C for 30 min was included. The amplification reaction was verified on 1.5% agarose gels before capillary electrophoresis was performed on a genetic analyzer ABI 3500 (Applied Biosystems). Subsequent analyses were carried out with the software GeneMarker version 1.95 (SoftGenetics, State College, Pennsylvania, USA). The primer sequences, GenBank accession numbers, type of repetitive pattern (RM), annealing temperature (Ta), and code for multiplex electrophoresis of the 21 microsatellite loci are described in Table 1.

Each primer was tested in 72 juvenile trees (CAP ≤ 15 cm) collected from three different populations (n = 24 each), in the town of Una, Bahia (Brazil): Nova Angelica (NA) Cachoeira Farm (FC), and Mota Farm (FM).

The number of alleles per locus (A), observed heterozygosity (H<sub>o</sub>), expected heterozygosity (H<sub>e</sub>), and combined exclusion probability (Q) were calculated in CERVUS 3.0.3 (Kalinowski et al. 2007) and their values are shown in Table 2. The 15 loci studied had a maximum of 17 alleles per locus. The values obtained for H<sub>o</sub> and H<sub>e</sub> were between 0.154 and 0.955 and 0.337 and 0.945, respectively. All populations

showed significant values ( $p \leq 0.0031$ ) for the fixation index (F values per population: NA = 0.160; FC = 0.100; FM = 0.116). An excess of homozygotes in all populations might be due to the aggregated distribution of the species. The average combined probability of exclusion for the 15 loci studied was 0.9999754, which indicates the accuracy of these new genetic tools for paternity tests. Our loci did not present linkage disequilibrium (FSTAT 2.9.3.2, Goudet 2001). These microsatellite primers can be applied to different *V. officinalis* genetic studies, not only evolutionary and ecological research, and those of other species within the genus. These molecular tools will contribute to the knowledge of the southern Bahia endemic flora and will aid in the design of conservation strategies for the Atlantic Rainforest.



Table 1. Characteristics of 21 *Viola officinalis* microsatellite loci.

PRIMERS	PRIMER SEQUENCE (5' – 3')	GEN BANK #	REPEAT MOTIF	RANGE (bp)	$T_a(^{\circ}\text{C})$	MULTIPLEX
<b>Virofi 02</b>	F: TGCTCGGCATTGTTTCCAAG R: TTGGTAATATCAGAAAAGGATGGG	SAMN 02045360	(CAT) <sub>7</sub>	134-152	56	A
<b>Virofi 04</b>	F: TGCAATAACTTGACTCGAACCTG R: AGGGCCCACTAACATCATTG	SAMN 02045361	(GA) <sub>18</sub>	84	56	A
<b>Virofi 05</b>	F: CCATGCACTCAAGGGGCTC R: AGTATCCTGATGCATTGTCTGC	SAMN 02045362	(TG) <sub>12</sub>	86	58	A
<b>Virofi 07</b>	F: TGGAACAGAATGCTGGGAAG R: TGCAACACTGATCTTGTGCG	SAMN 02045363	(AC) <sub>12</sub>	164-170	58	C
<b>Virofi 08</b>	F: AGCAACAATCAATGGTGGGG R: TCGTTGTCCTTCTCCTAGCC	SAMN 02045364	(TGG) <sub>8</sub>	158-182	56	C
<b>Virofi 09</b>	F: TGTTTGGCATGTGCTAAGTTG R: GGTGCATAGACCCCAAAACC	SAMN 02045365	(TG) <sub>14</sub>	163-199	58	B
<b>Virofi 10</b>	F: TACGGTGCGATGTTTTCGTG R: CACATGACCTCCGTCGTTTC	SAMN 02045366	(GA) <sub>16</sub>	126-180	58	A
<b>Virofi 11</b>	F: ACAGCACAGATGCAACAATTAAG R: GAATGGAATGGCGAAGCAGG	SAMN 02045367	(ATC) <sub>9</sub>	134-167	60	A
<b>Virofi 12</b>	F: GAGTTTTGTCCTACTCTGCTGG R: TGCAAGTTGGGCGTTGATTG	SAMN 02045368	(AC) <sub>11</sub>	170-198	58	B
<b>Virofi 13</b>	F: CCGTTTGGAAGCCTTGTCTC R: ACACGGTTTGCCGTTTATTC	SAMN 02045369	(AC) <sub>12</sub>	132-156	58	B
<b>Virofi 14</b>	F: ACTACATGCCAGTGGTTACAG R: TGCTGATACTTCCATTGTTGC	SAMN 02045370	(CA) <sub>13</sub>	125-139	60	B
<b>Virofi 15</b>	F: GAGTGTCTGCGTTTTCAATCTG R: TGCATACGCTCGAAGAGGAG	SAMN 02045371	(GA) <sub>13</sub>	166-216	58	C
<b>Virofi 16</b>	F: ACATGAGATGATTTGCCCTCC R: ATTGCTGATAGGTGATGCCC	SAMN 02045372	(AC) <sub>13</sub>	82	56	A
<b>Virofi 17</b>	F: ACCATGCCCACCTGTAATCC R: AATTCTTTCAGAAGCACCCAG	SAMN 02045373	(AG) <sub>12</sub>	199-255	54	B
<b>Virofi 18</b>	F: GGAACCTGCATCTGAAAGGG R: TCTGTAGTCAACACCTGATAGTTC	SAMN 02045374	(AC) <sub>13</sub>	229-253	56	C
<b>Virofi 19</b>	F: AGCCTCTACTTCTCAGACTGTTC R: CCCACCACCTAGTAGTGCC	SAMN 02045375	(TGA) <sub>8</sub>	134	54	B
<b>Virofi 20</b>	F: AACAACTCCATTGAACCACTC R: TGAATCACTTCCACAGTTGACC	SAMN 02045376	(TG) <sub>16</sub>	111-174	58	B
<b>Virofi 21</b>	F: GGCATCGCCGGATCATTAC R: TCCGCTTTCAGGTGAGAAAAC	SAMN 02045377	(AG) <sub>11</sub>	167-203	58	B
<b>Virofi 22</b>	F: TGTCCTGTTTTAAAGCGTAGG R: CATGGGAGTCACGATGGTTG	SAMN 02045378	(TG) <sub>17</sub>	141-161	60	A
<b>Virofi 23</b>	F: AGACATGGTCATGGTGGAGC R: TCTGTCACAATGTCAGGAGG	SAMN 02045379	(GAC) <sub>7</sub>	83	52	A
<b>Virofi 24</b>	F: TAGGGCAAATAAGCGGGGG R: ACGGGAGTTGAGCCATACTG	SAMN 02045380	(TG) <sub>11</sub>	140	60	C

A = octaplex 1 / B = octaplex 2 / C = hexaplex

Table 2. Genetic characterization of 15 microsatellite loci in three *Virola officinalis* populations. A = number of alleles, H<sub>o</sub> = observed heterozygosity, H<sub>e</sub> = expected heterozygosity, Q = combined probability of exclusion, I = probability of identity, F = fixation index

LOCO	NOVA ANGÉLICA (15°14'53.30"S, 39° 4'45.80"W)						FAZENDA CACHOEIRA (15° 5'33.56"S, 39° 7'30.45"W)						FAZENDA MOTA (15°20'24.08"S, 39°11'6.10"W)					
	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	Q	I	F	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	Q	I	F	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	Q	I	F
<b>Virofi 2</b>	1	0	0	1	1	0	6	0.308	0.612	0.406	0.195	0.497	1	0	0	1	1	0
<b>Virofi 7</b>	3	0.6	0.54	0.638	0.32	-0.111	3	0.292	0.386	0.678	0.421	0.243	2	0.412	0.337	0.78	0.506	-0.222
<b>Virofi 8</b>	4	0	0.652	0.475	0.206	1	2	1	1	0.719	0.375	0	4	0.412	0.594	0.569	0.268	0.306
<b>Virofi 9</b>	9	0.864	0.85	0.158	0.05	-0.0164	6	0.833	0.767	0.297	0.103	-0.086	9	0.833	0.844	0.185	0.061	0.013
<b>Virofi 10</b>	10	0.955	0.866	0.13	0.04	-0.103	9	0.833	0.855	0.146	0.045	0.026	9	0.737	0.811	0.199	0.068	0.091
<b>Virofi 11</b>	6	0.737	0.583	0.435	0.214	-0.264	7	0.875	0.659	0.344	0.152	-0.328	4	0.571	0.468	0.604	0.34	-0.220
<b>Virofi 12</b>	12	0.857	0.841	0.142	0.047	-0.019	10	0.773	0.774	0.226	0.083	0.001	10	0.769	0.846	0.162	0.054	0.091
<b>Virofi 13</b>	5	0.5	0.714	0.371	0.148	0.299	8	0.913	0.842	0.174	0.055	-0.084	3	0.5	0.833	0.507	0.211	0.399
<b>Virofi 14</b>	5	0.571	0.726	0.331	0.125	0.213	5	0.75	0.737	0.357	0.129	-0.018	4	0.6	0.563	0.505	0.253	-0.065
<b>Virofi 15</b>	15	0.8	0.945	0.043	0.012	0.153	9	0.353	0.847	0.167	0.053	0.583	13	0.875	0.875	0.114	0.036	0
<b>Virofi 17</b>	16	0.765	0.936	0.053	0.015	0.183	13	0.87	0.88	0.107	0.033	0.011	8	0.9	0.847	0.192	0.063	-0.062
<b>Virofi 18</b>	8	0.55	0.821	0.19	0.063	0.330	9	0.783	0.835	0.166	0.054	0.062	4	0.571	0.495	0.576	0.324	-0.153
<b>Virofi 20</b>	12	0.357	0.873	0.128	0.041	0.591	7	0.154	0.849	0.178	0.057	0.818	7	0.6	0.911	0.171	0.055	0.341
<b>Virofi 21</b>	5	0.762	0.681	0.417	0.171	-0.119	4	0.333	0.352	0.717	0.465	0.053	4	0.4	0.778	0.385	0.145	0.485
<b>Virofi 22</b>	5	0.647	0.715	0.363	0.142	0.095	10	0.875	0.688	0.326	0.138	-0.271	4	0.308	0.403	0.64	0.4	0.235
<b>Mean</b>	116*	0.597	0.716	0.999**	1.06x10 <sup>-16</sup>	0.160	108*	0.663	0.738	0.999**	4.47x10 <sup>-15</sup>	0.100	86*	0.565	0.640	0.999**	1.3x10 <sup>-12</sup>	0.116

\*Sum of the values \*\*Combined values

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Deborah Maria de Faria, Dr. Cassio van Berg, Dr. Maria Cristina López Roberts, MsC. Daniele França, Horlei Ribeiro, and all members of the Molecular Markers Laboratory, UESC for technical assistance. This work was supported by the SISBIOTA Project (563216/2010-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERENCES

Eklom R, Galindo J (2011) Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 107: 1–15. doi:10.1038/hdy.2010.152

Goudet, J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Lausanne University, Switzerland. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> Accessed 13 April 2013

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099-1006. 2007. doi: 10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x

Martini AMZ, Fiaschi P, Amorim AM, Paixão JL (2007) A hot-point within a hot-spot: a high diversity site in Brazil's Atlantic Forest. *Biodiv and Conserv* 16(11):3111-3128 doi: 10.1007/s10531-007-9166-6

Rodrigues WA (1980) Revisão Taxonômica das espécies de *Virola* Aublet (Myristicaceae) do Brasil. Tese. University of Campinas / UNICAMP. vol. I e II.



# Capítulo 2

**ESTRUTURA GENÉTICA DE *Virola officinalis* Warb  
(MYRISTICACEAE) EM FRAGMENTOS FLORESTAIS IMERSOS  
EM PAISAGENS COM DIFERENTES  
PORCENTAGENS DE COBERTURA VEGETAL.**

Flora Bittencourt.<sup>1,2</sup>; Roberto Tarazi.<sup>1</sup>; Fernanda Gaiotto.<sup>1,2,3</sup>; Deborah Maria de Faria<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório Marcadores Moleculares – Universidade Estadual de Santa Cruz

<sup>2</sup> Programa de Pós Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade -  
Universidade Estadual de Santa Cruz

<sup>3</sup>Correspondência para gaiotto@uesc.br

## **RESUMO**

No sul da Bahia, os remanescentes de Floresta Ombrófila Densa estão inseridos em paisagem heterogênea, com matrizes variando de impermeáveis a permeáveis a depender da espécie. Eventos de fragmentação podem levar a perda de habitat, prejudicando a qualidade ambiental, a dispersão e o recrutamento de espécies arbóreas. Com a diminuição de indivíduos numa população ou a extinção local, o *pool* gênico sofre prejuízos, acarretando em diminuição da diversidade genética para cada espécie. Para avaliar o impacto da perda de cobertura florestal sobre a diversidade genética de populações da arbórea endêmica *Virola officinalis*, foram realizadas correlações entre parâmetros de diversidade genética, obtidos através de análises com microssatélites específicos e a porcentagem de cobertura florestal existente em cada sítio amostral. O coeficiente de coancestria ( $F_{ST}$ ) apresentou diversidade moderada entre as populações amostradas e, após análises por pares de populações, verificou-se maior diferença entre as áreas com 15.5% e 39.6% de cobertura florestal. Análises de tendência revelaram maior endogamia ( $F_{IS}$ ) em áreas com menor porcentagem de cobertura florestal, assim como a diminuição de alelos por população. A correlação entre distância genética e geográfica não apresentou resultado significativo, excluindo a hipótese de isolamento por distância. Sugere-se que eventos recentes de fragmentação e perda florestal ainda não afetaram a diversidade entre as populações, porém indicam tendência de déficit de diversidade genética. Medidas para conservação deverão ser direcionadas às áreas com maior porcentagem de cobertura florestal, promovendo a manutenção da diversidade ainda existente. Para áreas com menores porcentagens de cobertura florestal, onde as estimativas e correlações apresentaram-se mais prejudiciais à manutenção da qualidade ambiental, o estímulo à agroflorestas, preservação de leitos de rios e atividades de restauração é aconselhado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Espécies arbóreas; Genética de populações; Floresta Tropical Atlântica; Locus neutros; Diversidade, microssatélites.

## INTRODUÇÃO

A Floresta Ombrófila Densa do sul da Bahia possui os maiores fragmentos de Floresta Atlântica do Brasil. Está classificada como *hotspot* de biodiversidade (LAURENCE, 2009) e abriga muitas espécies endêmicas, de reconhecida importância ecológica. Impactos ambientais sofridos por esse ambiente devido, principalmente, a ação antrópica tem diminuído o tamanho e o número dos remanescentes florestais na região, comprometendo a fauna e flora que abrigam (FARIA et al. 2009).

A perda de cobertura florestal é um problema ambiental capaz de interromper ou dificultar interações ecológicas como polinização, dispersão e as relações tróficas, além de interromper processos sucessionais dinâmicos e acentuar o efeito de borda, excluindo determinados nichos, e ainda acrescentar espécies generalistas e reduzir as especialistas (FAHRIG, 2002; ANDRÉN, 1994; CONNELL, 1978).

Em isolados florestais, a combinação do contexto de paisagem com as características fisiológicas e históricas da população pode contribuir para perda de diversidade genética de plantas, pois quando a comunicação entre fragmentos está comprometida, a movimentação da fauna é limitada, dificultando o fluxo gênico entre indivíduos distantes (OLIVEIRA et al, 2010; CROUZEILLES et al, 2010; FARIA et al, 2009; SOLÓRZANO et al, 2009; MARTINS et al, 2008). Assim, a população pode sofrer efeito gargalo considerando o isolamento das manchas de habitat e da própria redução dos indivíduos na paisagem, dificultando processos reprodutivos, evolutivos, sistemas de acasalamento e de fluxo gênico, além de potencialmente provocar deriva genética nas gerações subsequentes (BITTENCOURT & SEBBENN, 2009).

Nos municípios de Una e Belmonte, no sul da Bahia, as paisagens estão classificadas como variegadas por apresentarem áreas de pasto, monoculturas e cabruças (plantação de cacau em consórcio com outras espécies arbóreas para sombreamento) inseridas entre os remanescentes florestais (MARTINI, 2002). Além disso, ainda encontramos plantações de eucalipto e de seringa entre áreas de floresta nativa em diversos estágios de sucessão. Entretanto, a qualidade da matriz nem sempre está preservada, pois muitas dessas matrizes são impermeáveis e, a depender da espécie, inabitáveis ou intransponíveis.

*Virola officinalis* Warb., vulgarmente chamada de bicuíba branca, é uma arbórea endêmica da Floresta Ombrófila Densa do sul da Bahia (PESSOA et al. 2011).

Semidecídua, heliófita e lenhosa, é capaz de habitar florestas em diferentes estágios sucessionais (RODRIGUES, 1980; CARDOSO, 1994; MARIANO, 2004; JAHNEL, 2008). Apesar da literatura apresentar contradições quanto a classe ecológica a qual pertence, no presente estudo foi encontrada em áreas consideradas como florestamadura, em estágios intermediário e tardio de sucessão. Intolerante a sombra, é capaz de recrutar em áreas de borda e clareiras na floresta. Apresenta flores diminutas, organizadas em inflorescências, provavelmente polinizadas por dípteros. Suas sementes são grandes, variando entre 3 e 5 cm, provavelmente dispersas por animais de médio a grande porte. (RODRIGUES, 1980).

A ocorrência em áreas com diferentes porcentagens de cobertura florestal possibilitou a designação da *V. officinalis* como modelo biológico nesta investigação, sendo considerados sítios amostrais os remanescentes que apresentavam número suficiente de indivíduos jovens por população para realização de estudo genético.

No presente estudo, objetivou-se quantificar e comparar parâmetros genéticos populacionais de *V. officinalis* em remanescentes inseridos em paisagens com diferentes porcentagens de cobertura florestal, a fim de responder as seguintes questões (1) a redução da porcentagem de cobertura florestal está influenciando na diversidade genética em populações de *Virola officinalis* no Sul da Bahia? (2) está ocorrendo isolamento nestas populações? (3) há presença de locos sob seleção que possam interferir na interpretação dos valores genéticos estimados?

## METODOLOGIA

### 1. Área de estudo e delineamento amostral

A presente investigação foi idealizada a partir do Macro-projeto SISBIOTA, coordenado pela Dra. Deborah Faria. Trata-se de um projeto em rede, agregando seis universidades brasileiras e tem como objetivo principal avaliar como processos funcionais e a conservação da biodiversidade poderão ser afetados pela fragmentação e perda de habitat na Floresta Atlântica brasileira.

Atualmente, devido principalmente as atividades humanas, alguns dos remanescentes florestais existentes nos municípios de Una e Belmonte, na Bahia apresentam paisagem heterogênea, composta por áreas de pastagem, cabucas, plantações de eucalipto e remanescentes florestais (Figura 3), situação que influencia a

manutenção da biodiversidade, pois algumas matrizes poderão ser impermeáveis a determinadas espécies.

Nessa faixa de Floresta Ombrófila Densa, as fitofisionomias existentes são similares entre si e estudo preliminar de Pessoa et al. (dados não publicados) revelam igual composição de espécies vegetais entre os sítios determinados entre os municípios, encontrando diferenças na estrutura e nos estágios de desenvolvimento e secundarização florestal.

Assim, os pontos de amostragem nestes dois municípios foram determinados a partir da porcentagem de cobertura florestal.



Figura 5: Fisionomia de um remanescente florestal amostrado em Belmonte, Bahia.  
Foto: Flora Bittencourt, 2012.

A designação das classes de porcentagens de cobertura florestal foi realizada a partir de imagens de satélites Landsat, obtidas em 2012, e do reconhecimento das áreas em campo, para validação dos pontos e das estimativas de cobertura florestal.

Após a validação, os sítios que poderiam ser utilizados foram numerados para identificação. Nas imagens de satélite foi calculada a porcentagem de cobertura florestal



existente em uma área do entorno de cada sítio amostral, a partir de *buffer* traçados de tamanho crescente, iniciando em 500m de raio, tendo o maior *buffer* 2000 m de raio, determinando-se uma escala de porcentagens de cobertura florestal (Figura 6).

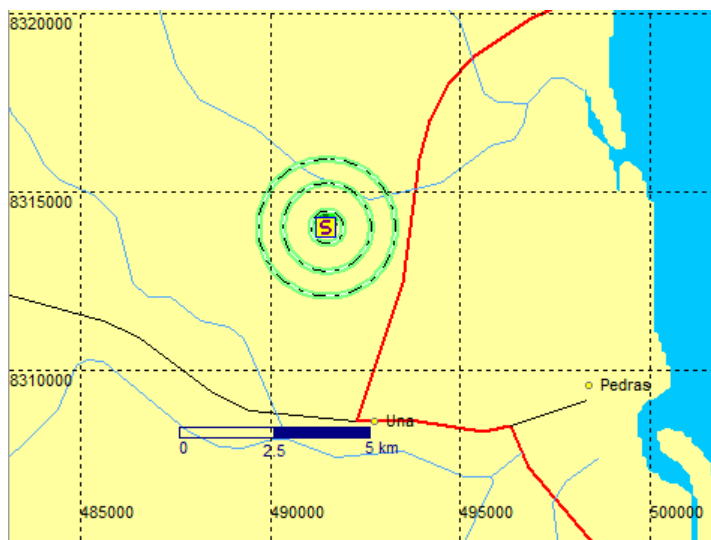


Figura 6: Delineamento amostral: "S" é o ponto central do sítio amostral. Cada círculo verde representa um *buffer* imaginário (500m a 2000m) onde a porcentagem de cobertura florestal foi estimada.

A exigência para considerar o sítio válido para a investigação esteve no valor de porcentagem de cobertura florestal no *buffer* com raio acima de 2 km, onde a estimativa de porcentagem de cobertura deveria ser igual ou menor do que a porcentagem estimada para o ponto central do sítio. Foram excluídos do estudo sítios muito próximos (1 km) visando assegurar a independência dos dados coletados. Além disso, objetivou-se excluir o efeito de fonte, ou seja, a existência de áreas com maiores porcentagens de cobertura florestal próximas aos sítios considerados e, dessa forma, estarem influenciando padrões e processos nos locais de coleta.

Os sítios foram determinados em classes de porcentagens de cobertura florestal, a saber: 0-20%, 21-40%, 41-60% e 61-80%. Para cada classe de porcentagem designada, foi determinado um sítio de coleta. Os locais foram escolhidos a partir de determinação de porcentagem de cobertura florestal, acessibilidade e presença de número significativo de indivíduos de *V. officinalis*. O tamanho ou forma do fragmento não foi considerada neste estudo, pois trata-se de estudo de paisagem e não de fragmentação. O local e a porcentagem de cada um dos sítios amostrados estão representados na Figura 7. É válido afirmar que não foi possível encontrar um

número relevante de amostras de *V. officinalis* nas áreas com menos de 15,5% de cobertura florestal.

## 1. Análise da estrutura genética

Por população amostral, pelo menos 24 indivíduos jovens ( $CAP \leq 15$  cm) da espécie alvo foram encontrados, georreferenciados, marcadas com numeração e código de identificação, totalizando 96 indivíduos utilizados no estudo. A distribuição das amostras por população está evidenciada na Figura 8.

Em laboratório, o DNA foi extraído das folhas coletadas através do protocolo de DOYLE e DOYLE, (1990)

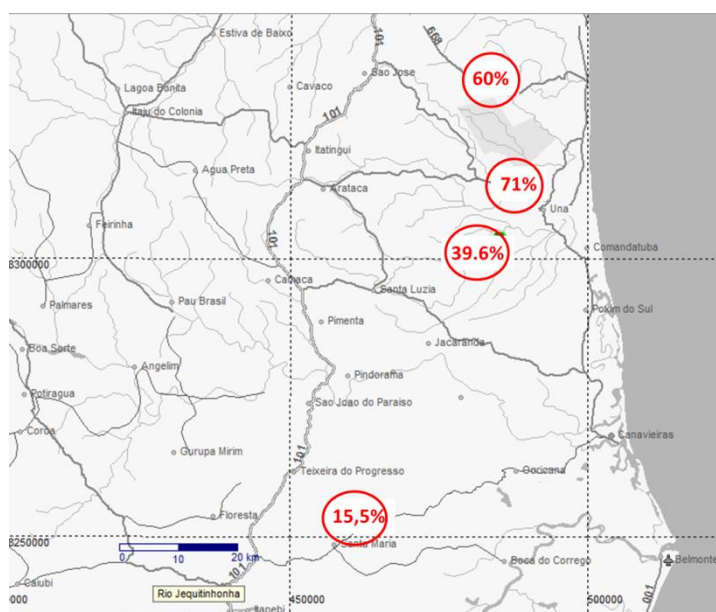


Figura 7: Localização e porcentagem dos sítios amostrados.

A concentração do DNA extraído foi estimada através da visualização e comparação com DNA de concentração conhecida de bacteriófago lambda, em gel de agarose 0,8%, corado com Gel Green<sup>TM</sup> (Nucleic Acid Gel Stain) e verificado em transiluminador de led.

Para diagnosticar a situação da diversidade genética das populações-alvo, foram utilizados 15 marcadores moleculares microssatélites desenvolvidos por Bittencourt et al. (2013), específicos para *V. officinalis*. Para as reações de amplificação utilizamos um

mix (13uL) com 7.5 ng de DNA genômico, 1,3 µL de Tampão 10X, 3,25 mM de cada dNTP, 3,25 mg/mL de BSA, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), 3,9 mM da mistura do primer *reverse* com o primer *forward* marcado com 6-FAM (CACGACGTTGTAAAACGA), somados a 1,43 mM de fluorocromo *dye-labeled* M13 (6-FAM, VIC, PET, ou NED, Applied Biosystems). No termociclador, ocorreram 35 ciclos compostos por 1 minuto a 94°C, 45 segundos a temperatura de anelamento específica para cada primer (variou entre 52°C a 60°C) e 72°C por 1 minuto, seguido por 8 ciclos: 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Por fim, foram somados 30 minutos a 72°C para extensão final da molécula.

A reação de amplificação foi verificada em gel de agarose 1,5% e em eletroforese capilar em sequenciador ABI 3500 Series Genetic Analyzer. As análises subsequentes foram realizadas utilizando o programa GeneMarker versão 1.95 (SoftGenetics, State College, Pennsylvania, USA).

A presença de locos *outliers* foi testada através do software Lositan (ANTAO et al. 2008), através do cálculo da probabilidade, para cada um dos locos, de estar sob seleção, baseado no modelo de mutação *stepwise* e médias pareadas do  $F_{ST}$ . Todas as estimativas de parâmetros genéticos populacionais foram realizadas com e sem os locos sob seleção, para efeitos de comparação.

O número de alelos por loco ( $A$ ), heterozigiosidade esperada ( $H_E$ ) e heterozigiosidade observada ( $H_o$ ) por população foram estimados utilizando o software CERVUS 3.0.3 (KALINOWSKI et al. 2007). Para as estimativas de divergência genética ( $F_{ST}$ ) entre pares de populações e no total e de coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) de cada população, o software FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001) foi empregado. A hipótese de isolamento por distância foi testada através da correlação entre as estimativas de  $F_{ST}$  e a distância geográfica, ambos estimados por pares de populações, utilizando o teste de Mantel parcial, também no software FSTAT.

Para cada parâmetro genético estudado foi realizado o teste F e posteriormente o Teste de Tukey relacionado com as porcentagens de cobertura florestal, através de análises de variância – ANOVA, no software BioEstat (AYRES et al. 2007). Gráficos de linha de tendência foram construídos, correlacionando os sítios com a menor e a maior porcentagem de cobertura florestal e os parâmetros genéticos estimados. Dessa forma buscou-se encontrar possível tendência para variação dos parâmetros, frente ao gradiente da variável cobertura florestal.

Por fim, foram realizadas análises de regressões preliminares para verificação de correção entre a estruturação genética e o gradiente de porcentagem de cobertura florestal.

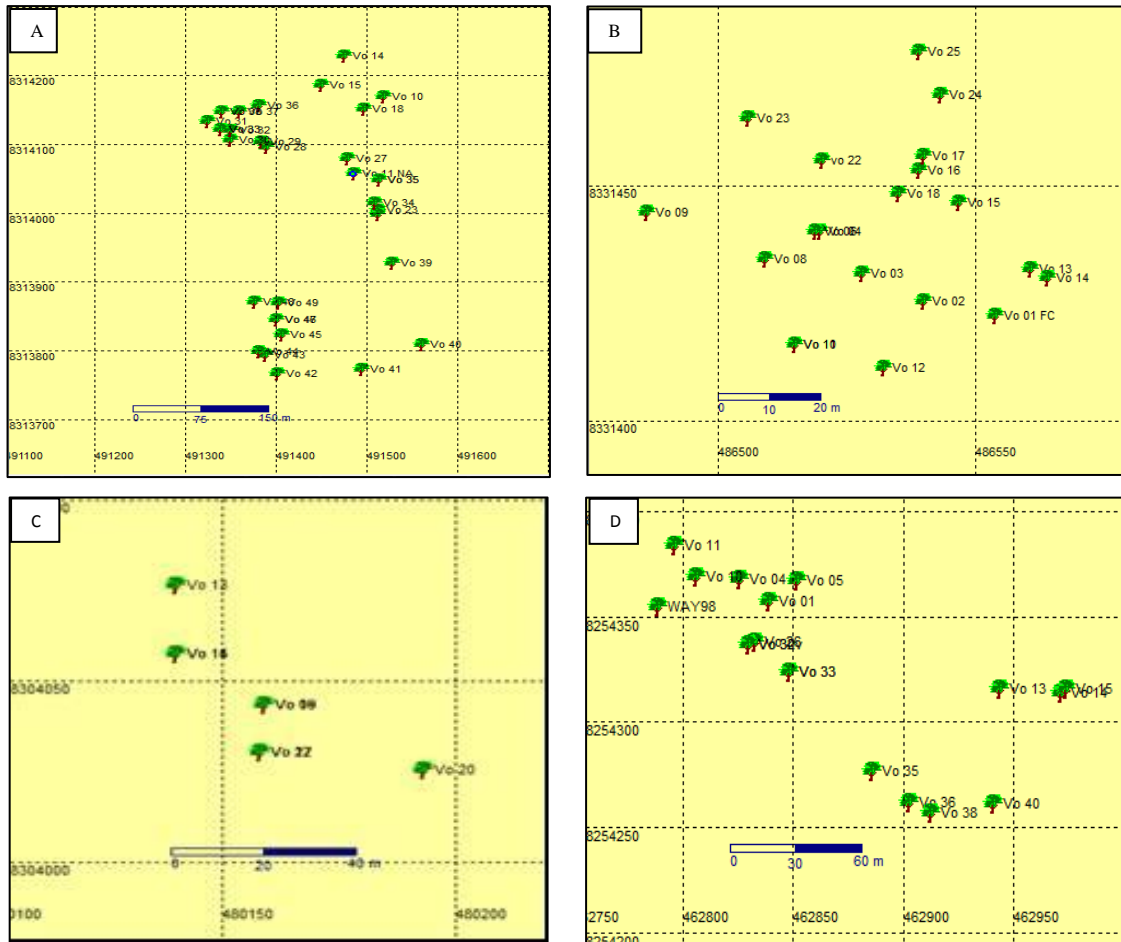


Figura 8: Distribuição das amostras nos sítios de coleta. A = sítio 71% de cobertura florestal, B = sítio 60% de cobertura florestal, C = sítio 39.6% de cobertura florestal, D = sítio 15.5% de cobertura florestal. Devido a distribuição agregada da espécie, alguns pontos georreferenciados abrangem mais de um indivíduo de *V. officinalis*.

## RESULTADOS

As análises dos 15 locos para investigar a presença de outliers indicaram a presença de três locos que não se adequavam ao modelo de neutralidade de seleção. O gráfico do resultado da análise (Figura 8) indicou que os locos: Virofi\_2 ( $F_{ST} = 0,62$  e  $p = 0,99$ ), Virofi\_8 ( $F_{ST} = -0,10$  e  $p = 0,0$ ) e Virofi\_20 ( $F_{ST} = 0,10$  e  $p = 0,99$ ) são *outliers*.

Para averiguar a influência dos locos *outliers* nas populações examinadas, foram realizadas análises considerando todos os 15 locos polimórficos e descartando aqueles apontados pelo software como estando sob seleção.

A tabela 3 apresenta os resultados das análises dos parâmetros de diversidade, por população, com os 15 locos totais e com apenas 12, após remoção dos 3 locos identificados como *outliers*.

Observa-se que a retirada dos locos *outliers* diminuiu a amplitude do intervalo de confiança no geral, tornando as análises com 12 locos mais robustas. Na paisagem com apenas 15.5% de cobertura florestal, por exemplo, o parâmetro  $F_{IS}$  apresentou aumento considerável no valor estimado quando foi recalculado, sendo o maior valor alcançado quando comparado o  $F_{IS}$  entre as populações. Ainda nesta população, foi estimado o menor valor para a heterozigiosidade observada ( $H_o$ ).

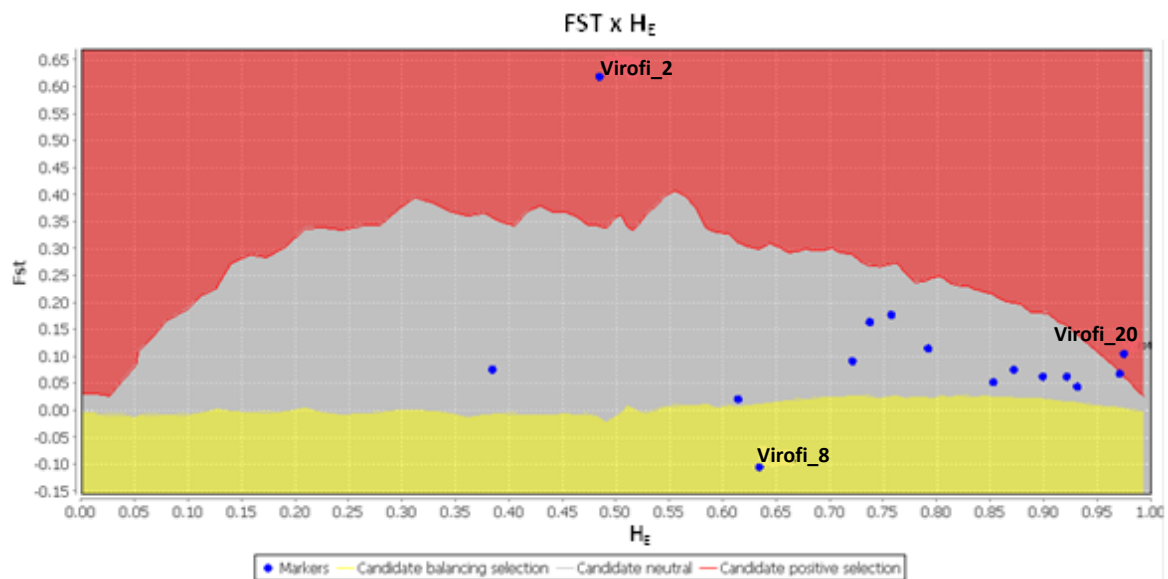


Figura 9. Relação entre  $F_{ST}$  e  $H_E$ , a partir do modelo de migração de Ilhas, para detecção de valor muito alto ou muito baixo de  $F_{ST}$ , comparado às expectativas de neutralidade dos marcadores microssatélites. A cor cinza representa a área de confiança para neutralidade (95%) dos locos estudados. Na área vermelha e na amarela estão os locos positivamente candidatos à seleção, identificados como locos *outliers* – Virofi\_2 / Virofi\_8 / Virofi\_20.

A população de bicuíba inserida na paisagem com 39.6% de cobertura florestal apresentou o menor número total de alelos.

A estimativa de  $F_{ST}$  entre todas as populações também sofreu variação com a retirada dos locos *outliers*. Na análise com 15 locos, o intervalo de confiança (95%) esteve entre 0.055 e 0.141, sendo o valor do parâmetro = 0.087. Após repetir a análise

sem os locos outliers, o valor do  $F_{ST}$  foi 0.075 e o intervalo de Confiança (95%) apresentou-se entre 0.054 e 0.100. Por tornar a análise mais robusta, foi utilizado o valor da segunda análise (12 locos) para correlações entre a cobertura florestal e os parâmetros genéticos estimados.

As estimativas do índice de coancestria ( $F_{ST}$ ) apresentaram diversidade significativas entre as populações ( $F_{ST} = 0.075$ ), já que o valor do  $F_{ST}$  embora pequeno, foi significativamente diferente de zero (IC a 95%). Ao aplicar o Teste de Mantel parcial a fim de relacionar o valor desse parâmetro com a distância geográfica dos pares de populações não foi observada a significância dos resultados ( $r=0.249$  e  $p \geq 0.05$ ). A Tabela 4 apresenta os valores estimados para  $F_{ST}$  por pares de populações e as distâncias geográficas entre as mesmas.

As populações mais distantes entre si estão inseridas nas paisagens com 15.5% e 60% de cobertura florestal (81 Km). Porém o maior valor estimado para o  $F_{ST}$  foi estimado entre as populações localizadas em 39.6% e 60% com 28 km de distância ( $F_{ST} = 0.133$ ).

A análise de variância (ANOVA) entre os diferentes parâmetros genéticos e o gradiente de porcentagem de cobertura florestal não indicou que há variação correspondente entre a variável dependente e independente, indicado através do valor de  $p$  não significativo ( $\alpha = 0,05$ ).

Tabela 3. Comparação entre as médias dos parâmetros estimados por população com 12 e 15 locos microsatélites.

	<b>71%</b>				<b>60%</b>				<b>39.6%</b>				<b>15.5%</b>			
	<b>12 locos</b>	<b>IC</b>	<b>15 locos</b>	<b>IC</b>	<b>12 locos</b>	<b>IC</b>	<b>15 locos</b>	<b>IC</b>	<b>12 locos</b>	<b>IC</b>	<b>15 locos</b>	<b>IC</b>	<b>12 locos</b>	<b>IC</b>	<b>15 locos</b>	<b>IC</b>
<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	0.054	0.175 -0.067	0.082	0.326 -0.028	0.015	0.166 -0.135	0.022	0.273 -0.072	0.057	0.217 -0.102	0.034	0.222 -0.045	0.18	0.318 0.042	0.108	0.312 0.054
<b><i>H<sub>o</sub></i></b>	0.717	0.808 0.626	0.597	0.845 0.587	0.706	0.856 0.557	0.663	0.820 0.505	0.623	0.749 0.496	0.565	0.699 0.432	0.589	0.728 0.450	0.532	0.663 0.402
<b><i>H<sub>E</sub></i></b>	0.768	0.850 0.685	0.716	0.746 0.448	0.718	0.831 0.605	0.738	0.837 0.639	0.675	0.804 0.545	0.640	0.785 0.495	0.725	0.863 0.587	0.682	0.822 0.542
<b><i>A</i></b>	99	10.947 5.552	116	10.205 5.261	93	9.5699 5.930	108	8.837 5.562	74	8.364 3.968	86	7.610 3.855	96	10.41 5.251	112	9.796 5.137

\* IC = Intervalo de Confiança a 95%.

Tabela 4.  $F_{ST}$  (diagonal inferior) e distância geográfica (diagonal superior) entre pares de populações amostradas.

	<b>71%</b>	<b>60%</b>	<b>39.6%</b>	<b>15.5%</b>
<b>71%</b>		18 Km	15 Km	66 Km
<b>60%</b>	0.049		28 Km	81 Km
<b>39.6%</b>	0.082	0.133		53Km
<b>15.5%</b>	0.045	0.067	0.103	
<b><i>F<sub>ST</sub> geral:</i></b>	0.075			

A Figura 10 representa uma análise comparativa entre os sítios e estimativas de diversidade genética. Notou-se um aumento expressivo do índice  $F_{IS}$ , relacionado a endogamia (Gráfico D, Figura 10), na população com apenas 15,5% de cobertura florestal. Antagonicamente, o mesmo gráfico revelou que o mesmo índice para a população com 60% de cobertura florestal está muito abaixo das demais populações.

Análises de regressões preliminares entre os parâmetros genéticos e as diferentes porcentagens de cobertura florestal foram realizadas mesmo sabendo-se da baixa quantidade de pontos de amostragem ( $n=4$ ) para este tipo de análise. Estes resultados revelaram uma tendência linear à perda de diversidade com a perda de cobertura, sendo o parâmetro  $F_{IS}$  o mais acentuado. Por ter ciência da necessidade de mais pontos de amostragem para a realização deste tipo de análise, os resultados preliminares estão apresentados no Anexo I.

Correspondências realizadas entre locos isolados considerando apenas duas populações com extremos de cobertura florestal (15,5% e 71% de cobertura florestal) também apresentaram tendência de resposta ao gradiente de perda de cobertura florestal (Anexo II).

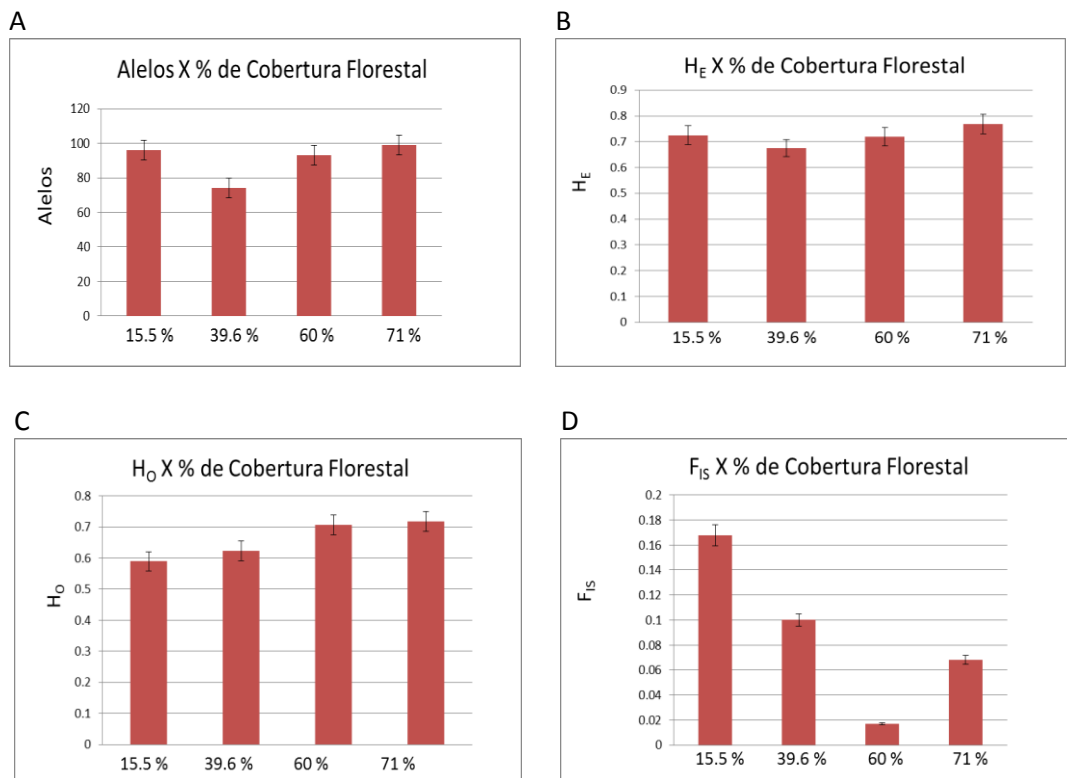


Figura 10: Comparação entre os Sítios de coleta e as estimativas de diversidade. Barras de Erro padrão foram inseridas.  $H_E$  = heterozigossidade esperada /  $H_O$  = heterozigossidade observada /  $F_{IS}$  = índice de fixação.



## DISCUSSÃO

Estudos já realizados afirmam que o tipo de matriz no entorno de fragmentos florestais é um fator limitante para a qualidade ambiental, influenciando o tipo de paisagem, relações ecológicas e grupos taxonômicos existentes (FAHRIG, 2001). Nesta investigação observou-se que nos locais mais impactados, a manutenção da diversidade genética para a espécie estudada está ameaçada e que índices genéticos relacionados como coeficiente de endogamia já apontam valores preocupantes. Atentos a conservação da biodiversidade no Sul da Bahia, buscou-se discutir os resultados encontrados frente à realidade local, pesquisando possíveis explicações para as correlações descobertas.

A primeira delas foi a existência de locos microssatélites *outliers*, os quais causaram diferenças nas estimativas dos parâmetros genéticos considerados. Ao reanalisar a relação entre os parâmetros ( $A$ ,  $H_E$ ,  $H_o$  e  $F_{IS}$ ) e perda de porcentagem de cobertura florestal, as diferenças entre os valores obtidos não foram significativamente relevantes, porém, neste estudo, a retirada dos locos *outliers* diminuiu a amplitude do intervalo de confiança, proporcionando maior robustez às análises dos resultados. Outras investigações similares apresentaram também um pequeno número de locos *outliers* microssatélites e foram excluídos com a intenção de manter o rigor das análises (CAMPITELLI e STINCHCOMBE, 2013; OETJEN et al. 2010; NOSIL et al. 2009; MILLER et al. 2007).

A existência de locos *outliers* pode causar esse tipo de alteração devido a sua localização no genoma (LUIKART et al. 2003). Sabe-se que os locos *outliers* poderão estar diretamente relacionados a adaptação já que possivelmente encontram-se inseridos ou conectados a genes (BEAUMONT e NICHOLS, 1996; ROBERTSON, 1975; LEWONTIN e KRAKAUER, 1973). Por representar diferenças entre populações causadas por pressão de seleção, a utilização dos mesmos não é justificável para correlacionar as variáveis dependentes e independentes. Na ausência de seleção, a variação esperada pelo loco depende fortemente do padrão de relações entre populações (ROBERTSON, 1975).

Apesar da retirada dos locos *outliers* ter proporcionado melhor interpretação do resultado, ao observar a correlação dos valores numéricos estimados com o gradiente de cobertura florestal, não foram percebidas diferenças significativas.

Os resultados sugerem modificação na variabilidade genética frente a diminuição da porcentagem de floresta. Para a população existente na paisagem com apenas 15.5% de cobertura florestal, o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), por exemplo, apresentou valor alto (0.18, Tabela 3). Com ampla zona de contato entre o habitat original e áreas modificadas no entorno, o efeito de borda leva a condições microclimáticas distintas das originais devido ao aumento da radiação solar, aumento da temperatura e diminuição da umidade por exemplo. Dentre as consequências ambientais a longo prazo, estão a exposição ao vento, o que proporciona a queda de árvores, reduzindo a cobertura do dossel (MURCIA, 1995), a mudança da vegetação original por espécies características de áreas perturbadas ricas em lianas e trepadeiras e a substituição de espécies especialistas por generalistas, devido a tolerância aos efeitos microclimáticos modificados. Portanto, as observações deste estudo corroboram com o esperado para áreas impactadas, apresentando resultados preocupantes para a qualidade ambiental destas paisagens. Porém existem outras influências não mensuradas nesta investigação que poderão estar contribuindo para o cenário verificado.

Análises de regressão preliminares entre parâmetros genéticos e gradiente de cobertura florestal (Anexo 2) também revelaram uma tendência a mudanças genéticas em relação a perda de cobertura florestal. O parâmetro  $F_{IS}$ , que indica a endogamia ocorrente dentro da população, novamente se destacou entre os analisados, pois o seu valor esteve cerca de duas vezes maior em paisagens com menor área de floresta quando comparado com valores obtidos para paisagens imersas em maiores porcentagens de cobertura florestal.

A ocorrência de um banco de plântulas ou sementes poderá levar a uma permanência de alelos independentemente dos impactos sofridos pelo ambiente, favorecendo a manutenção da diversidade alélica nas áreas de habitat de *V. officinalis*. Porém não existem estudos que comprovem que a espécie possui essas estratégias biológicas de manutenção de propágulos por longo prazo.

O sítio de coleta na paisagem com 15.5% de cobertura florestal (Figura 5) encontra-se rodeado por áreas de pasto, com árvores e arbustos escassos ao longo dessas áreas circundantes. O pisoteio do gado e a ausência de animais de grande porte (também visados nas atividades de caça) proporcionam redução de recrutamento e de dispersão de sementes, respectivamente, contribuindo para a redução da população de arbóreas e para o isolamento do fragmento. Dessa forma, acredita-se que essa realidade está contribuindo com o aumento da endogamia para a espécie estudada.

Para heterozigosidade, as diferenças existentes entre os valores observados e esperados para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi maior no sítio com 15,5% de cobertura florestal, possivelmente devido a cruzamentos entre indivíduos próximos aparentados ou desvios decorrentes da deriva genética no processo de combinações entre os gametas durante a fecundação. Em isolados florestais, devido a falta de comunicação entre indivíduos de populações diferentes, poderá haver fixação de alelos e perda de diversidade genética. Consequentemente, com o passar do tempo, populações isoladas tendem a tornar-se diferentes geneticamente entre si, mesmo que tenham sido derivadas de uma mesma população original. Concordando com o esperado, os valores encontrados para alelos exclusivos neste estudo já apontam para uma divergência genética em curso, entre as populações amostradas.

Para o coeficiente de divergência genética ( $F_{ST}$ ), as estimativas para todas as populações investigadas, detectou diversidade moderada. Considerando haver na amostragem indivíduos de 4 populações distantes em pelo menos 18 Km entre si, imersos em paisagem variegada, é interessante observar que a migração de gametas e/ou sementes poderá estar persistindo. Contudo, estudos genéticos com arbóreas, mesmo jovens, poderão refletir situação ambiental antepassada, já que são indivíduos longevos e muitas vezes possuem estratégia de manutenção para a diversidade genética.

A hipótese de isolamento por distância foi testada e refutada a partir do teste de Mantel parcial, o qual não apresentou resultado significativo ( $r = 0.249$ ). Sugere-se que a manutenção dos valores próximos de diversidade gênica possa estar ocorrendo mediante dispersão genética explicada pelo modelo de alpondras, devido a zoocoria por longas distâncias (tucanos e macacos por exemplo). Uma segunda hipótese, de maior credibilidade, está na coancestralidade. Sugere-se que no passado, quando todos os remanescentes florestais estavam inseridos numa grande área de Floresta Ombrófila Densa, as populações agora isoladas estavam interconectadas pela manutenção de fenômenos genético-ecológicos como o fluxo gênico e a dispersão. Devido a longevidade e a diversidade genética das árvores apresentar-se naturalmente rica, eventos de desmatamento, fragmentação e perda de habitat causarão perdas genéticas que poderão se percebidas tardiamente pelas populações de arbóreas (BACLES e JUMP, 2011).

Como passar dos anos, a floresta foi sofrendo impactos causados principalmente por ações antrópicas, o que levou ao isolamento de algumas populações. A distância de polinização também pode estar influenciando esta situação. Os principais polinizadores

para o gênero são os dípteros (CARDOSO et al. 1994; LENZA; OLIVEIRA, 2006), com alcance de vôo entre 50 a 800 metros de distância a depender da espécie (ACHEE et al. 2007). Nesse caso, com o passar do tempo em isolados florestais, árvores portanto muito afastadas poderão não ter a chance de trocar gametas.

Quando calculado o  $F_{ST}$  por pares de população, as diferenças não foram significativas, porém observa-se o maior valor existente entre as populações imersas em 60% e 39.6% de cobertura florestal, seguida pelo valor entre as populações com 39.6% e 15.5%. Entre as áreas de 71% e de 60% de cobertura florestal, encontramos a Reserva Biológica de Una, o que poderá estar facilitando o trânsito de dispersores e, dessa forma, aproximando as populações desses remanescentes.

Percebeu-se durante as coletas a existência de indivíduos recrutados a menos de um metro de distância uns dos outros, favorecendo a troca de gametas entre parentes diretos e conseqüentemente, a endogamia. É interessante notar que cruzamentos interparentais não contribuem para introdução de novos alelos, visto que influenciam apenas nas frequências genotípicas da população e não na substituição de um conjunto gênico por outro. Dessa forma, há um aumento na possibilidade de exclusão ou redução de alelos deletérios na manifestação de genes letais, comprometendo indivíduos e como consequência a expressão de carga genética, promovendo indiretamente a alteração das frequências gênicas da população. Assim, apesar de não significantes, sugere-se que as diferenças genéticas observadas entre populações poderão ser resultado do isolamento dos remanescentes florestais com 39.6% e 15.5% de cobertura florestal.

O presente estudo foi realizado com apenas uma espécie, capaz de habitar florestas maduras, secundárias intermediárias e tardias, assim como áreas de cabucas, e detectou aumento do coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) para população inserida em paisagem com 15.5% de cobertura florestal. Espécies arbóreas climáticas, de baixa densidade, ameaçadas ou relacionadas à exploração madeireira poderão sofrer mais rapidamente as consequências negativas relacionadas à redução de cobertura florestal, como redução da distância de fluxo gênico e da dispersão de suas sementes, acarretando no aumento da endogamia e na diminuição da diversidade gênica.

Foram visitadas quatro áreas na classe de 0-20% de cobertura florestal, sendo verificado um número significativo de indivíduos para este estudo (24 amostras) em apenas um sítio com 15,5% de cobertura corroborando com os dados acima descritos.

Perante esses dados, recomenda-se que medidas para conservação sejam tomadas visando inicialmente o aumento de porcentagem de cobertura florestal para os

remanescentes imersos em paisagens entre 15.5% e 39.6%, de forma a diminuir a probabilidade de perda de diversidade genética pelo isolamento.

Para áreas com apenas 15.5% de cobertura sugere-se campanhas de restauração, assim como o incentivo a sistema de plantio agroflorestal com objetivo de aumentar a variabilidade do mosaico, proporcionando a existência de habitats para diversos animais e plantas da região, inclusive da *Virola officinalis*, recomendada para esse tipo de atividade relacionada à restauração.

Acredita-se que programas de incentivos governamentais, a partir da valorização dos sistemas agroflorestais, de áreas preservadas, assim como aquelas relacionadas aos leitos dos rios e as nascentes, poderão contribuir com a manutenção dos remanescentes ainda existentes na região do Sul da Bahia por agregar renda à prática de conservação.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração da MsC. Daniele França pela valiosa contribuição ao trabalho, ao técnico Horlei Ribeiro, responsável pelo sequenciador ABI 3500, do Dr. Cassio vanBerg, pela disponibilidade e parceria, do Dr. Julio Baumgarten e da Dra. Eliana Cazeta, pela colaboração nas análises, a MsC. Letícia Ferraço pela disponibilidade da foto do fruto de *V. officinalis*, a MsC. Michaele Pessoa e a todo o grupo de pesquisadores do Laboratório Marcadores Moleculares (UESC) pela colaboração em diversas etapas da investigação, ao Projeto SISBIOTA (563216/2010-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERÊNCIAS

ACHEE, N. L.; GRIECO, J. P.; ANDRE, R. G.; REJMANKOVA, E. E DONALD R.. **A mark-release-recapture study using a novel portable hut design to define the flight behaviors of *Anopheles vestitipennis* and *Anopheles albimanus* in Belize, Central America.** Journal of the American Mosquito Control Association, 23(3): 276-282. 2007.

ANDRÉN, H. **Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: a review.** OIKOS, n. 71, p. 355-366. Copenhagen 1994

AVISE, J. C. **Perspective: conservation genetics enters the genomics era.** Conservation genetics, n. 11(2), p. 665-669. 2010.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas.** 334 p. Belém, 2007.

BACLES, C.F.E.; JUMP, A.S. **Taking a tree's perspective on forest fragmentation genetics.** Trends in plant science, v. 16, n. 1, p. 13-18, 2011.  
doi:10.1016/j.tplants.2010.10.002

BARRETO, R.M.F. (2007) **Uso do hábitat pela preguiçade-coleira *Bradypus torquatus* Illiger 1811, no sul da Bahia, Brasil.** Dissertação, Universidade Estadual de Santa Cruz. Bahia, Brazil.

BEAUMONT, M. A.; NICHOLS, R. A. **Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure.** Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 263(1377), 1619-1626. 1996. doi: 10.1098/rspb.1996.0237

BITTENCOURT, F; TARAZI, R; GAIOTTO, F.A. **Development of microsatellite markers for *Virola officinalis* Warb.(Myristicaceae), an endemic tree of the Brazilian Atlantic rain forest by next generation sequencing technology.** Conservation Genetics Resources, p. 1-4. 2013. DOI: 10.1007/s12686-013-0010-x

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. **Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil.** Tree Genetics & Genomes, n. 5(4), p. 573-582. 2009.

BOREM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares.** 2 ed. Viçosa, UFV. 532p. 2009.

BUEHLER, D; PONCET, BN; HOLDEREGGER, R; MANEL, S; TABERLET, P; GUGERLI, F. **An outlier locus relevant in habitat-mediated selection in an alpine plant across independent regional replicates.** Evolutionary Ecology, 27(2), 285-300. 2013.

CAMPITELLI, B. E., & STINCHCOMBE, J. R. **Natural selection maintains a single-locus leaf shape cline in Ivyleaf morning glory, *Ipomoea hederacea*.** Molecular ecology, 22(3), 552-564. 2013

CARDOSO, M.A.; CUNHA, R.; PEREIRA, T.S. **Germinação de sementes de *Virola surinamensis* (ROL.) Warb. (Myristicaceae) e *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae).** R Bras de Sementes 16:1-5. 1994.  
<http://www.abrates.org.br/revista/artigos/1994/v16n1/artigo01.pdf> Acesso em 13 de Abril de 2013

COCKERHAM, C.C. **Higher order probability functions of identity of alleles by descent.** Genetics, v. 69, n. 2, p. 235, 1971. Acesso em 14 de Abril de 2012. Em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1212700/pdf/235.pdf>

CONNELL, J. H. **Diversity in tropical rain forests and coral reefs.** *Science* 199(24): 1302-1310. 1978

CROUZEILLES, R.; LORINI, M.L., GRELLE, C.E.V. **Deslocamento na matriz para espécies da Mata Atlântica ea dificuldade da construção de perfis ecológicos.** *Oecologia Australis*, n. 14(4), p. 872-900. 2010.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** *Focus* 12:13–15. 1990

ENGLAND, P. R.; USHER, A. V.; WHELAN, R. J.; AYRE, D. J. **Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana*.** *Molecular Ecology*, n. 11(6), p. 967-977. 2002.

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

FAHRIG, L. **Effect of habitat fragmentation on the extinction threshold: a synthesis.** *Ecological Applications*, n. 12(2), pp. 346–353. 2002.

FARIAS, G.S. **Estrutura genética de populações e filogeografia da acariquara (*Minquartia guianensis* Aubl., Olacaceae )** Dissertação (mestrado)-- INPA, Manaus. 84 p. 2010.

GOUDET, J **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices** (version 2.9. 3). Lausanne University, Switzerland. 2001  
<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> Accessed 13 April 2013

GOUVEIA, O.S. **Padrão de atividades, dieta e uso do espaço de um grupo de *Cebus xanthosternos* (Wied-Neuwied, 1820) (primates, cebidae), na reserva biológica de Una, Bahia, Brasil.**Dissertação, Universidade Estadual de Santa Cruz. 2009.

GUICHOUX, E.; GARNIER-GÉRÉ, P.; LAGACHE, L.; LANG, T.; BOURY, C.; PETIT, R.J. **Outlier loci highlight the direction of introgression in oaks.** *Molecular ecology*, 22(2), 450-462. 2013 DOI: 10.1111/mec.12125

JAHNEL, V. **Proposta de delineamento de um pomar de sementes de espécies florestais nativas.** Monografia apresentado ao Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 50 p.2008.

KALINOWSKI; S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. **Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment.** *Mol Ecol* 16:1099-1006. 2007. doi: 10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x

LAURANCE, W.F. **Conserving the hottest of the hotspots.** *Biological Conservation* 142, 1137. 2009.

LENZA, E; OLIVEIRA, P.E. **Reprodução de *Virola sebifera* em mata mesofítica.** R Bras de Bot. 29(3):443-451. 2006.  
<http://www.scielo.br/pdf/0D/rbb/v29n3/a11v29n3.pdf> Acesso: 13 April 2013

LEWONTIN, R. C.; KRAKAUER, Jesse. **Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms.** Genetics, v. 74, n. 1, p. 175-195, 1973. <http://www.genetics.org/content/74/1/175.full.pdf+html>

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.R. **Ecological determinants of genetic structure in plant mutation.** Annual Review of Ecology and Systematics, n. 15, p. 65-95. 1984.

LUIKART, G.; ENGLAND, P.R.; TALLMON, D.; JORDAN, S.; TABERLET, P. **The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing.** Nature Reviews Genetics, 4(12), 981-994. 2003.

MAGUIRE, T. L.; SAENGER, P.; BAVERSTOCK, P.; HENRY, R. **Microsatellite analysis of genetic structure in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae).** Molecular Ecology, n. 9(11), p. 1853-1862. 2001.

MARIANO, E. **Efeitos da fragmentação sobre comunidades arbustivo-arbóreas em Mata Atlântica, Una BA.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2004.

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

MARTINI, A.M.Z. **Estrutura e composição da vegetação e chuva de sementes em sub-bosque, clareiras naturais e área perturbada por fogo em floresta tropical no sul da Bahia. Campinas.** Tese de doutorado: Universidade Estadual de Campinas. 2002.

MARTINI, A.M.Z.; FIASCHI, P.; AMORIM, A.M.; PAIXÃO, J.L. **A hot-point within a hot-spot: a high diversity site in Brazil's Atlantic Forest.** Biodiv and Conserv 16(11):3111-3128. 2007. doi: 10.1007/s10531-007-9166-6

MILLER, N.J.; CIOSI, M.; SAPPINGTON, T.W.; RATCLIFFE, S.T.; SPENCER, J.L.; GUILLEMAUD, T. **Genome scan of *Diabrotica virgifera virgifera* for genetic variation associated with crop rotation tolerance.** Journal of Applied Entomology, 131(6), 378-385. 2007. doi: 10.1111/j.1439-0418.2007.01190.x

NEI, M. **F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations.** Annals of human genetics, 41(2), 225-233. 1977. Doi: 10.1111/j.1469-1809.1977.tb01918.x

NOSIL, P.; HARMON, L.J.; SEEHAUSEN, O. **Ecological explanations for (incomplete) speciation.** Trends in Ecology & Evolution, v. 24, n. 3, p. 145-156, 2009.. doi:10.1016/j.tree.2008.10.011



NYBOM, H. **Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants.** Mol Ecol13(5):1143-1155. 2004. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x

OETJEN, K.; FERBER, S.; DANKERT, I.; REUSCH, T. B. **New evidence for habitat-specific selection in Wadden Sea *Zostera marina* populations revealed by genome scanning using SNP and microsatellite markers.** Marine biology,157(1), 81-89. 2010. DOI: 10.1007/s00227-009-1297-8

OLIVEIRA, R.R. de; MONTEZUMA, R.D.C.M. **História ambiental e ecologia da paisagem.** Mercator-Revista de Geografia da UFC, n. 19, p. 117-128. 2010.

PESSOA, M.S.; CAZETTA, E. **Relação entre Perda de Habitat na Riqueza de Espécies e Diversidade Funcional de Frutos Zoocóricos em comunidades arbóreas na Floresta Atlântica do Sul da Bahia.** Doutorando em andamento. Universidade Estadual de Santa Cruz. PROJETO SISBIOTA, dados não publicados. 2013.

PESSOA, M.S.; VLEESCHOUWER, K.M.; AMORIM, A.M.; TALORA, D.C. **Calendário Fenológico: uma ferramenta para auxiliar no cultivo de espécies arbóreas nativas da Floresta Atlântica no Sul da Bahia.** Volume 1. Editus. ISBN 978-85-7455-216-3. 2011

ROBERTSON, A. **Gene frequency distributions as a test of selective neutrality.** Genetics, v. 81, n. 4, p. 775-785, 1975.  
<http://www.genetics.org/content/81/4/775.full.pdf+html>

RODRIGUES, W.A. **Revisão Taxonômica das espécies de *Virola Aublet*(Myristicaceae) do Brasil.**Tese. University of Campinas / UNICAMP. vol. I e II. 1980.

SMULDERS, M. J. M.; VAN DER SCHOOT, J.; ARENS, P.; VOSMAN, B. **Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.).**Molecular Ecology Notes, n. 1(3), p. 188-190. 2001.

SOLÓRZANO, A.; DE OLIVEIRA, R. R. Geografia, História e Ecologia: criando pontes para a interpretação da paisagem. Ambiente & Sociedade, n. 12(1), p. 49-66. 2009.

WRIGHT, S. **The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating.** Evolution, 395-420. 1965. Acesso em 14 de Abril de 2012.

Em:<http://www.jstor.org/discover/10.2307/2406450?uid=3737664&uid=2134&uid=2&uid=70&uid=4&sid=21102034883991>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação de processos evolutivos é atualmente reconhecida como prioridade para esforços na preservação ambiental. Frente a necessidade de desenvolvimento de estratégias de manejo e práticas agrícolas sustentáveis, o estudo dos remanescentes e a designação de locais emergenciais torna-se útil para execução das atividades de conservação elaboradas.

Visando atender às expectativas da atualidade, desenvolveu-se 15 primers para a amplificação de regiões repetitivas do tipo microsatélite específicos para a espécie endêmica *Virola officinalis*. Todo o procedimento de desenvolvimento e caracterização foi realizado com sucesso e o conjunto de ferramentas poderá ser utilizado em trabalhos futuros com esta espécie ou com outras congênicas. Com a aplicação e análise dos locos desenvolvidos, percebeu-se que a espécie responde geneticamente à perda de cobertura florestal, tendo menor estimativa de diversidade genética nas populações imersas em paisagens com menor porcentagem de florestas. Isto poderá desencadear uma série de impactos genético-evolutivos como aumento da endogamia, fixação de alelos e manifestação de alelos deletérios, comprometendo a espécie estudada e, conseqüentemente, a fauna a ela associada. Outras espécies de arbóreas poderão estar em igual situação ou ainda pior, por exemplo aquelas características de estágios clímax ou as visadas para o corte devido a utilização madeireira, as quais sofrerão com a extração direcionada, além da modificação da matriz na paisagem.

Infelizmente o crescimento econômico e populacional tendem a manifestar-se de maneira cada vez mais agressiva frente aos remanescentes florestais da região, substituindo-os por monoculturas, áreas de pastagem, estradas e cidades. Assim, iniciativas como estímulos a agricultura sustentável, como sistemas de plantio agroflorestais, a criação de corredores ecológicos entre remanescentes, estratégias de manutenção de nascentes e áreas próximas ao leito dos rios apresentam-se como promissoras por permitir o uso sustentável da terra.

É importante salientar que as populações inseridas nas paisagens de Una, as quais apresentam melhores estimativas de diversidade genética neste estudo, deverão ser consideradas em iniciativas de conservação. Nestas populações a diversidade genética dos jovens ainda está assegurada e poderá servir como fonte para as populações adjacentes.

Sugere-se ao final desse estudo que medidas para conservação sejam direcionadas inicialmente para áreas com maior porcentagem de cobertura florestal, pois abrigam maior diversidade genética e podem servir como fontes para o *pool* gênico de outros locais. Para áreas com menor porcentagem de cobertura florestal, medidas de restauração dos pequenos fragmentos ainda existentes objetivando a recuperação do entorno, como o estímulo a agroflorestas e manutenção de leitos dos rios, proporcionará aumento da área de floresta e diminuição o efeito de borda. Além disso, favorecer a comunicação entre remanescentes facilitará o trânsito de dispersores e conseqüentemente de sementes através da paisagem, mantendo a conectividade e tornando a matriz mais permeável e diversa à sobrevivência coletiva.

### REFERÊNCIAS CONSULTADAS

ACHEE, N. L.; GRIECO, J. P.; ANDRE, R. G.; REJMANKOVA, E. E DONALD R.. **A mark-release-recapture study using a novel portable hut design to define the flight behaviors of *Anopheles vestitipennis* and *Anopheles albimanus* in Belize, Central America.** Journal of the American Mosquito Control Association, 23(3): 276-282. 2007.

AGURELL, S.; HOLMSTEDT, B.; LINDGREN, J. E.; SCHULTES, R. E. **Alkaloids in certain species of *Viola* and other South American plants of ethnopharmacologic interest.** Acta Chemica Scandinavica, n. 23, v. 3, p. 903-916. 1969

ALENCAR, M. H. **Aspectos da concentração da produção de cacau e da estrutura fundiária na região cacauzeira do Estado da Bahia.** Centro de Pesquisas do Cacau, DICOM Division de Comunicação. 1970.

ALMEIDA, T.M.de; GÓES, L.M.; TEIXEIRA, A.C. de O. **CLIMEP – Climatologia e Estudos da Paisagem.** Rio Claro, São Paulo, v.6, n.1-2, jan./dez.2011. <http://www.periodicos.rc.biblioteca.unesp.br/index.php/climatologia/index>

ALVES, M. F. **Caracterização in situ e estrutura genética de populações de *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt.** Tese (doutorado). Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Ciências Naturais, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil. 86 p. 2009.

ALVES, S.A.; POMELLA, A.W.; AITKEN, W.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Curvas de progresso e gradientes da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Bahia.** *Fitopatologia Brasileira*, 31(5), 483-491. 2006.

ALVES JR, F. T., BRANDÃO, C. F., ROCHA, K. D., MARANGON, L. C., FERREIRA, R. L. **Efeito de borda na estrutura de espécies arbóreas em um**

**fragmento de Floresta Ombrófila Densa, Recife, PE.** Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária) Brazilian Journal of Agricultural Sciences, 1(1), 49-56. 2007.

AMORIM, R.R.; OLIVEIRA, R.C. de. **Degradação ambiental e novas territorialidades no extremo sul da Bahia.** Caminhos de Geografia Uberlândia v. 8, n. 22, p. 18 – 37 set. 2007.

ANDRÉN, H. **Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: a review.** OIKOS, n. 71, p. 355-366. Copenhagen 1994

APARICIO, A.; HAMPE, A; FERNÁNDEZ-CARRILLO, L.; ALBALADEJO, R. G. **Fragmentation and comparative genetic structure of four mediterranean woody species: complex interactions between life history traits and the landscape context.** Diversity and Distributions, n. 18(3), p. 226-235. 2011.

ARMSTRONG, J. E.; TUCKER, S. C. **Floral development in Myristica (Myristicaceae).** American journal of botany, p. 1131-1143. 1986.

Access on line:

<http://www.jstor.org/discover/10.2307/2443792?uid=1477871&uid=3737664&uid=5909624&uid=2&uid=3&uid=67&uid=62&uid=37447&sid=21101470511197>

ARMSTRONG, J. E.; WILSON, T. K. **Floral morphology of Horsfieldia (Myristicaceae).** American Journal of Botany, p. 441-449. 1978.

Access on line:

<http://www.jstor.org/discover/10.2307/2442701?uid=1477871&uid=3737664&uid=5909624&uid=2&uid=3&uid=67&uid=62&uid=37447&sid=21101470511197>

ARMSTRONG, J. E.; WILSON, T. K. **Wood anatomy of Horsfieldia (Myristicaceae).** IAWA Bulletin, n. 1, v. 3, p. 121-129. 1980.

AVISE, J. C. **Perspective: conservation genetics enters the genomics era.** Conservation genetics, n. 11(2), p. 665-669. 2010.

AZEVEDO, A. **Regiões climato-botânicas do Brasil.** Estudo fitogeográfico e florestal. Anuário Brasileiro de Economia Florestal 11:201-232. 1950.

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

BACLES, C.F.E.; JUMP, A.S. **Taking a tree's perspective on forest fragmentation genetics.** Trends in plant science, v. 16, n. 1, p. 13-18, 2011.

doi:10.1016/j.tplants.2010.10.002

BALKENHOL, N.; GUGERLI, F.; CUSHMAN, S.A.; WAITS, L.P.; COULON, A.; ARNTZEN, J.W.; HOLDEREGGER, R.; WAGNER, H.H. **Identifying future research needs in landscape genetics: where to from here?.** Landscape Ecology, v. 24, n. 4, p. 455-463. 2009.

BARATA, L. E.; BAKER, P. M.; GOTTLIEB, O. R.; RÙVEDA, E. A. **Neolignans of *Virola surinamensis***. *Phytochemistry*, n. 17, v. 4, p. 783-786. 1978

BARATA, L. E.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; CROFT, S. L. **Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues**. *Phytochemistry*, n. 55(6), 589-595. 2000.

BARAZETTI, V.M.; SCCOTI, M.S.; LIMA, M.A.C.; SOUZA, J.P.F.; CURVELO, K.B.; LOBÃO, D.E.P. **Arboreto do Ceplac – espécies arbóreas potenciais ao sistema agrossilvicultural cacauero**. *Unoesc & Ciência – ACET*, Joaçaba, v. 2, n. 1, p. 31-46, jan./jun. 2011.

BARRETO, R.M.F. **Uso do hábitat pela preguiçade-coleira *Bradypus torquatus* Illiger 1811, no sul da Bahia, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2007.

BENDER, D. J; CONTRERAS, T.A.; FAHRIG L. **Habitat loss and population decline: a meta-analysis of the patch size effect**. *Ecology*, n. 79(2), pp. 517–533. 1998.

BETTS, M.G.; FORBES, G.J.; DIAMOND, A.W. **Thresholds in songbird occurrence in relation to landscape structure**. *Conservation Biology*, n. 21(4), p. 1046-1058. 2007.

BIELSCHOWSKY, R. **Formação econômica do Brasil: uma obra-prima do estruturalismo cepalino**. *Revista de economia política*, 9(4), 36. 1989.

BITTENCOURT, F; TARAZI, R; GAIOTTO, F.A. **Development of microsatellite markers for *Virola officinalis* Warb.(Myristicaceae), an endemic tree of the Brazilian Atlantic rain forest by next generation sequencing technology**. *Conservation Genetics Resources*, p. 1-4. 2013. DOI: 10.1007/s12686-013-0010-x

BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. **Genetic effects of forest fragmentation in high-density *Araucaria angustifolia* populations in Southern Brazil**. *Tree Genetics & Genomes*, n. 5, p. 573–582. 2009.

BIZOUX, J.P.; DAÏNOU, K.; BOURLAND, N.; HARDY, O.J.; HEUERTZ, M.; MAHY, G.; DOUCET, J.L. **Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in a low-density wind-pollinated tropical tree**. *Molecular ecology*, 18(21), 4398-4408. 2009. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04365.x

BOREM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. 2 ed. Viçosa, UFV.2009. 532p

BUEHLER, D; PONCET, BN; HOLDEREGGER, R; MANEL, S; TABERLET, P; GUGERLI, F. **An outlier locus relevant in habitat-mediated selection in an alpine**

**plant across independent regional replicates.** *Evolutionary Ecology*, 27(2), 285-300. 2013.

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

CARA, P.A.A. **Efeito de borda sobre a fenologia, as síndromes de polinização ea dispersão de sementes de uma comunidade arbórea na Floresta Atlântica ao norte do Rio São Francisco** (Doctoral dissertation, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 100pp). 2006.

CARDOSO, M.A.; CUNHA, R. da; PEREIRA, T.S. **Germinação de sementes de *Virola surinamensis* (ROL.) Warb. (Myristicaceae) e *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae).** Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 16, n.1, p.1-5. 1994.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras.** Brasília, DF: Embrapa Informações tecnológicas; Colombo: Embrapa florestas, v. 1, p. 1039, 2003.

CHARLESWORTH, D. **Plant sex determination and sex chromosomes.** *Heredity*, v. 88, n. 2, p. 94-101, 2002.

CI-BRASIL (Conservation International do Brasil), Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, IPÊ, SMA-SP & SEMAD-MG. **Avaliação e Ações Prioritárias para Conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos.** MMA/SBF, Brasília. 2000.

CLEMENTS, W.H.; VIEIRA, N.K.M.; SONDEREGGER, D.L. **Use of ecological thresholds to assess recovery in lotic ecosystems.** *J. N. Am. Benthol. Soc.*, n. 9(3), p. 1017–1023. 2010.

COCKERHAM, C.C. **Higher order probability functions of identity of alleles by descent.** *Genetics*, v. 69, n. 2, p. 235, 1971. Acesso em 14 de Abril de 2012. Em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1212700/pdf/235.pdf>

COLOMBO, A.F.; JOLY, C.A. **Climate change threatens the Atlantic Forest.** *Braz. J. Biol.*, vol. 70, no. 3 (suppl.), p. 697-708. 2010

CONNELL, J. H. **Diversity in tropical rain forests and coral reefs.** *Science* 199(24): 1302-1310. 1978

COUTO-SANTOS, F. R. **Fenologia de espécies arbóreas do dossel e sub-dossel em um fragmento de Mata Atlântica semi-decídua em Caratinga, Minas Gerais, Brasil.** Dissertação Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2007.

CROUZEILLES, R.; LORINI, M.L., GRELLE, C.E.V. **Deslocamento na matriz para espécies da Mata Atlântica ea dificuldade da construção de perfis ecológicos.** *Oecologia Australis*, n. 14(4), p. 872-900. 2010.

DA FONSECA, G.A.B. **The vanishing brazilian atlantic forest.** *Biological Conservation*, v. 34, n. 1, p. 17-34, 1985.

DI PIETRO, M. S. Z. **500 anos de direito administrativo brasileiro.** *Revista Eletrônica de Direito do Estado*, 5, 1-25. 2006.

DIGIOVINAZZO, P.; FICETOLA, G.F.; BOTTONI, L.; ANDREIS, C.; PADOA-SCHIOPPA, E. **Ecological thresholds in herb communities for the management of suburban fragmented forests.** *Forest Ecology and Management*, n. 259, p. 343–349. 2010.

DRINNAN, I.N. **The search for fragmentation thresholds in a Southern Sydney Suburb.** *Biological Conservation*, n. 124, p. 339–349. 2005.

DODDS, W.K.; CLEMENTS, W.H.; GIDO, K.; HILDERBRAND, R.H.; KING, R.S. **Thresholds, breakpoints, and nonlinearity in freshwaters as related to management.** *J. N. Am. Benthol. Soc.*, n. 29(3), p. 988–997. 2010.

DUBREUIL, M.; RIBA, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C.; VENDRAMIN, G. G.; SEBASTIANI, F.; MAYOL, M. **Genetic effects of chronic habitat fragmentation revisited: Strong genetic structure in a temperate tree, *Taxus baccata* (Taxaceae), with great dispersal capability.** *American journal of botany*, n. 97(2), p. 303-310. 2010.

ELLEMBERG, H.; MUELLER-DOMBOIS, D. A. **Tentative physiognomic-ecological classification of plant formations of the earth.** *Separata de Ber. Geobot. Inst. ETH, Zurich*. 1965/66.

ELLIS, T.M.; BETTS, M.G. **Bird abundance and diversity across a hardwood gradient within early seral plantation forest.** *Forest Ecology and Management*, n. 261, p. 1372–1381. 2011.

ENGLAND, P. R.; USHER, A. V.; WHELAN, R. J.; AYRE, D. J. **Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana*.** *Molecular Ecology*, n. 11(6), p. 967-977. 2002.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The principles of pollination ecology.** Pergamon Press, Oxford. 1966.

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

FAHRIG, L. **Effect of habitat fragmentation on the extinction threshold: a synthesis.** *Ecological Applications*, n. 12(2), pp. 346–353. 2002.

FAHRIG, L. **Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 34, p. 487-515. 2003.

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

FARIAS, G.S. **Estrutura genética de populações e filogeografia da acariquara (*Minuartia guianensis* Aubl., Olacaceae )** Dissertação (mestrado)-- INPA, Manaus. 84 p. 2010.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** EMBRAPA, Brasília, v. 3, 1998.

FISCHER, J.; LINDENMAYER, D.B. **Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis.** *Global Ecology and Biogeography*, n.16, p. 265–280. 2007.

FLORIANO, E.P. **Germinação e dormência de sementes florestais.** Caderno Didático n° 2, 1ª edição. 19 p. Santa Rosa. 2004.

FORMAN, R.T.T. **Some general principles of landscape and regional ecology.** *Landscape Ecology*, vol. 10, n. 3, p. 133-142. 1995. Access on line: [http://download.springer.com/static/pdf/562/art%253A10.1007%252FBF00133027.pdf?auth66=1353865695\\_eb92831d2705e3e8df427576ea79ff16&ext=.pdf](http://download.springer.com/static/pdf/562/art%253A10.1007%252FBF00133027.pdf?auth66=1353865695_eb92831d2705e3e8df427576ea79ff16&ext=.pdf)

GALETT, M.P.; LAPS, R.; PIZO, M.A. **Frugivory by Toucans (Ramphastidae) at Two Altitudes in the Atlantic Forest of Brazil'.** *Biotropica* 32(4b): 842-850 2000.

GIBBS, J.P. **Distribution of woodland amphibians along a forest fragmentation gradient.** *Landscape Ecology*, n. 13, p. 263–268. 1998.

GONÇALVES, S.P.C.N. **Três décadas de eucalipto no extremo sul da Bahia.** *GEOUSP - Espaço e Tempo*, São Paulo, n.31, p. 55 – 68. 2012.

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C.G. **The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47-79. 2005.

GOUVÊA, J.B.S. **Contribuição à geomorfologia do sul da Bahia: Área dos baixos cursos dos rios Pardo e Jequitinhonha.** Comunicação Técnica do Centro de Pesquisas do Cacau/Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira, Itabuna. v.35. 1969.

GOUVEIA, P. S. **Padrão de atividades, dieta e uso do espaço de um grupo de *Cebus xanthosternos* (Wied-Neuwied, 1820) (primates, cebidae), na reserva biológica de**



**Una, Bahia, Brasil.** Ilhéus: Bahia. Dissertação. Universidade Estadual de Santa Cruz, 132p. 2009.

GURGEL, E.S.C.; CARVALHO, A.C.M.; SANTOS, J.U.M. dos; SILVA, M.F. da. ***Virola surinamensis* (ROL. ex ROTTB.) Warb. (Myristicaceae): aspectos morfológicos do fruto, semente, germinação e plântula.** Belém. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais. Vol.1, n.2, p.37-46. Maio-ago. 2006.

HERRERA, J. M. **El papel de la matriz en el mantenimiento de la biodiversidad en hábitats fragmentados. De la teoría ecológica al desarrollo de estrategias de conservación.** Ecosistemas, n. 20, v. 2-3, p. 21-35. 2011.

HOLMSTEDT, B.; LINDGREN, J.E.; PLOWMAN, T.; RIVIER, L.; SCHULTES, R.E.; TOVAR, O. **Indole alkaloids in Amazonian Myristicaceae: field and laboratory research.** Botanical Museum leaflets, Harvard University. Cambridge, Massachusetts. Vol.28, p.215-234. Sep. 1980.

Access on line: <http://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/7542>

HOWE, H. F. **Dispersal of a neotropical nutmeg (*Virola sebifera*) by birds.** The Auk, p. 88-98. 1981. Access on line:

<http://www.jstor.org/discover/10.2307/4085611?uid=3737664&uid=2&uid=4&sid=21101475377927>

HOWE, H.F.; KERCKHOVE, G.A.V. **Removal of wild nutmeg (*Virola surinamensis*) crops by birds.** *Ecology*, 1093-1106. 1981. Access on line:

<http://www.jstor.org/discover/10.2307/1937007?uid=3737664&uid=2&uid=4&sid=21101475377927>

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

IBAMA/MMA. **Plano de manejo - Reserva Biológica de Una, Fase I.** Programa Nacional de Meio Ambiente. 1998.

JAHNEL, V. **Proposta de delineamento de um pomar de sementes de espécies florestais nativas.** Monografia apresentado ao Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 50 p.2008.

JAIN, S. K. **The evolution of inbreeding in plants.** *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 7, p. 469-495, 1976.

JARDIM, M.A.G. & MOTA, C.G. **Biologia floral de *Virola surinamensis* (ROL.) Warb. (Myristicaceae).** *Revista Árvore – Viçosa, MG.* v.31, n.6, p.1155-1162. 2007.

KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, C. D. A. **Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas nativas.** *Revista do IPEF*, n. 41(42), p. 88-93. 1989.

KIMURA, M.; WEISS, G.H. **The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance.** *Genetics*, v. 49, n. 4, p. 561, 1964.

- KING, R.S.; BAKER, M.E. **Considerations for analyzing ecological community thresholds in response to anthropogenic environmental gradients.** J. N. Am. Benthol. Soc., n. 29(3), p. 998–1008. 2010.
- KOBLITZ, R.V.; JÚNIOR, S.J.P.; AJUZ, R.C. de A.; GRELLE, C.E.V. **Ecologia de Paisagens e Licenciamento Ambiental.** Natureza & Conservação, 9(2), 244-248. 2011.
- KOEPPEL, W. **Climatologia. Con un estudio de los climas de la tierra.** Versión directa de Pedro R. Hendrichs Pérez. Fondo de Cultura Económica, Ciudad de México. 1948.
- LAURANCE, W.F. **Conserving the hottest of the hotspots.** Biological Conservation 142, 1137. 2009.
- LEITÃO FILHO, H. F. **Aspectos taxonômicos das florestas do estado de São Paulo.** In: Anais do Congresso Nacional Sobre Essências Nativas. Silvicultura em São Paulo – Instituto Florestal, Vol.16A, pt.1, p197. 1982
- LEITE, K. C. E.; COLLEVATTI, R. G.; MENEGASSO, T. R.; TOMAS, W. M.; DUARTE, J. M. B.; MATO GROSSO DO SUL, M. S. **Transferability of microsatellite loci from Cervidae species to the endangered Brazilian marsh deer, Blastocerus dichotomus.** Genet. Mol. Res, n. 6(2), p. 325-330. 2007.
- LENZA, E.; OLIVEIRA, P.E. **Reprodução de *Virola sebifera* em mata mesofítica.** Revista Brasileira de Botânica. Vol.29, n.3, p.443-451. Jul-set. 2006.
- LINDENMAYER, D.B.; LUCK, G. **Synthesis: Thresholds in conservation and management.** Biological Conservation, n. 124, p. 351–354. 2005.
- LINTZ, H.E.; MCCUNE, B.; GRAY, A.N.; MCCULLOH, K.A. **Quantifying ecological thresholds from response surfaces.** Ecological Modelling, n. 222, p. 427–436. 2011.
- LOPES, N.P.; CHICARO, P.; KATO, M.J.; ALBUQUERQUE, S.; YOSHIDA, M. **Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*.** Planta medica, n. 64(7), P. 667. 1998.
- LOPES, N. P.; KATO, M.J. de A; ANDRADE, E H.; MAIA, J.G.; YOSHIDA, M.; PLANCHART, A.R.; KATZIN, A. M. **Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians.** Journal of ethnopharmacology, 67(3), 313-319. 1999.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** São Paulo. Vol. 1. 4a. edição. Nova Odessa. Instituto Plantarum, 2002. 1949.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.R. **Ecological determinants of genetic structure in plant mutation.** Annual Review of Ecology and Systematics, n. 15, p. 65-95. 1984.

- MACARTHUR, Robert H.; WILSON, Edward O. **The theory of island biogeography**. Princeton University Press, 1967.
- MAGNANINI, A.; MAGNANINI, C. **Árvores gigantes da terra e as maiores assinaladas no Brasil**. São Paulo: CNRBMA, 2002. (Série Ciência e Pesquisa, nº. 2)
- MAGUIRE, T. L.; SAENGER, P.; BAVERSTOCK, P.; HENRY, R. **Microsatellite analysis of genetic structure in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae)**. *Molecular Ecology*, n. 9(11), p. 1853-1862. 2001.
- MANEL, S.; SEGELBACHER, G. **Perspectives and challenges in landscape genetics**. *Molecular Ecology*, n. 18, p.1821–1822. 2009.
- MARIANO, E. **Efeitos da fragmentação sobre comunidades arbustivo-arbóreas em Mata Atlântica, Una BA**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2004.
- MARTINI, A.M.Z. **Estrutura e composição da vegetação e chuva de sementes em sub-bosque, clareiras naturais e área perturbada por fogo em floresta tropical no sul da Bahia**. Campinas. Tese de doutorado: Universidade Estadual de Campinas. 2002.
- MARTINI, A.M.Z.; FIASCHI, P.; AMORIM, A.M.; PAIXÃO, J.L. da. **A hot-point within a hot-spot: a high diversity site in Brazil's Atlantic Forest**. *Biodiversity and Conservation*, v. 16, no. 11, p. 3111-3128. 2007.
- MARTINS, K.; SANTOS, J.D.dos; GAIOTTO, F. A.; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, P.Y. **Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal de Paranapanema, SP, Brasil**. *Revista Brasileira de Botânica*. Vol.31, n.1, p.61-69. jan-mar. 2008
- METZGER, J.P. **O Código Florestal tem base científica?** *Conservação e Natureza* n. 8 (1). 2010.
- MMA. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Conservation International do Brasil, Fundação MORAES, R.M. de; DOMINGOS, M. **Elementos minerais em folhas de espécies arbóreas**. São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica*. Vol.20(2), p.133-138. Dez. 1997.
- MORAES, R.M.de; DOMINGOS, M. **Elementos minerais em folhas de espécies arbóreas de Mata Atlântica e Mata de Restinga, na Ilha do Cardoso, SP**. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 20, n. 2, p. 133-138, 1997. DOI: 10.1590/S0100-84041997000200004.
- MORI, S. A.; BOOM, B. M.; DE CARVALHO, A. M.; DOS SANTOS, T. S.. Southern Bahian moist forests. *The Botanical Review*, 49(2), 155-232. 1983. Doi: 10.1007/BF02861011TI
- MURCIA, C. **Edge effects in fragmented forests: implications for conservation**. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(2), 58-62. 1995

- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; DA FONSECA, G.A.; KENT, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** *Nature*,403(6772), 853-858.2000. **Doi:** 10.1038/35002501
- NASCIMENTO, A. T. A.; NEVES, A. C. D. O.; MARTINS, R. P.; COUTINHO, F. Â. **Conservação da biodiversidade e dinâmica ecológica espacial: evolução da teoria.** *Oecologia Australis*, 16(2), 156-164. 2012
- NAZARENO, A. G. **Estrutura e diversidade genética de populações naturais de Ficus spp.(Moraceae) em fragmentos florestais no Estado de São Paulo.** Tese (doutorado). Universidade de São Paulo. 105 p. 2009.
- NEI, M. **F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations.** *Annals of human genetics*, 41(2), 225-233. 1977. **Doi:** 10.1111/j.1469-1809.1977.tb01918.x
- NYBOM, H. **Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants.** *Molecular Ecology*, n. 13(5), p. 1143-1155. 2004.
- OLIVEIRA JÚNIOR, C.J.F.; CABREIRA, P.P. **10679 - Espécies multiusos e sistemas agroflorestais na Mata Atlântica** Resumos do VII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Fortaleza/CE – 12 a 16/12/2011.
- OLIVEIRA, M.A.; GRILLO, S.A.; TABARELLI, M. **Forest edge in the Brazilian Atlantic Forest: drastic changes in tree species assemblages.***Oryx* 38, n. 4, p. 389-394. 2004.
- OLIVEIRA, E. F. de; GOULART, E. **Distribuição espacial de peixes em ambientes lênticos: interação de fatores.** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 22, p. 445-453, 2008.
- OLIVEIRA, R.R. de; MONTEZUMA, R.D.C.M. **História ambiental e ecologia da paisagem.** *Mercator-Revista de Geografia da UFC*, n. 19, p. 117-128. 2010.
- PACIÊNCIA, M.L.B.; PRADO J. **Efeitos de borda sobre comunidades de pteridófitas na Mata Atlântica da região de Una, sul da Bahia, Brasil.***Revista Brasil. Bot.* 27, n. 4, n. 641-653. 2004.
- PARDINI, R. **Effects of Forest fragmentation on small mammals in the Atlantic Forest landscape.** *Biodiversity and Conservation* 13, p. 2567-2586. 2004.
- PARDINI, R.; BUENO, A. DE A.; GARDNER, T.A.; PRADO, P.I.; METZGER, J.P. **Beyond the Fragmentation Threshold Hypothesis: Regime Shifts in Biodiversity Across Fragmented Landscapes.***PLoS ONE* 5(10): 2010 e13666. **doi:**10.1371/journal.pone.0013666
- PAULA, A.de; SOARES, J.J. **Estrutura horizontal de um trecho de floresta ombrófila densa das terras baixas na reserva biológica de Sooretama, Linhares, ES.FLORESTA,** Curitiba, PR, v. 41, n. 2, p. 321-334, abr./jun. 2011.

PESSOA, M.S.; VLEESCHOUWER, K.M.; AMORIM, A.M.; TALORA, D.C. **Calendário Fenológico: uma ferramenta para auxiliar no cultivo de espécies arbóreas nativas da Floresta Atlântica no Sul da Bahia**. Volume 1. Editus. ISBN 978-85-7455-216-3. 2011

PEREIRA, L.A.G.; LESSA, S.N. **O processo de planejamento e desenvolvimento do transporte rodoviário no Brasil**. Caminhos de Geografia Uberlândia v. 12, n. 40, p. 26-46 dez/2011.

PIVELLO, V.R ; METZGER, J.P. **Analysis of the research on Landscape Ecology in Brazil (2000-2005)**. Biota Neotrop., v. 7, n. 3. Sep/Dez 2007.  
<http://www.biotaneotropica.org.br/v7n3/pt/abstract?point-ofview+bn00107032007>.  
ISSN 1676-0603

PRATA, E.M.B.; ASSIS, M.A.; JOLY, C.A. **Floristic composition and structure of tree community on the transition Lowland – Lowermontane Ombrophilous Dense Forest in Núcleo Picinguaba/Serra do Mar State Park, Ubatuba, southeastern Brazil**. Biota Neotrop. 11(2). 2011. Access on line:  
<http://www.biotaneotropica.org.br/v11n2/en/abstract?inventory+bn02211022011>.

QIAN, S.S.; CUFFNEY, T.F. **To threshold or not to threshold? That's the question**. Ecological Indicators, n. 15, p. 1–9. 2012.

RADFORD, J.Q.; BENNETT, A.F.; CHEERS, G.J. **Landscape-level thresholds of habitat cover for woodland-dependent birds**. Biological Conservation, n. 124, p. 317–337. 2005.

RISTERUCCI, A. M.; DUVAL, M. F.; ROHDE, W.; BILLOTTE, N. **Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L.** Molecular Ecology Notes, n. 5(4), p. 745-748. 2005.

RICHTER, H. G.; NOCK, H. P.; REICHMANN, Neto, F. **Bicuiba (*Virola oleifera*). Aspectos dendrológicos da espécie e descrição macro e microscópica da madeira**. Floresta, n. 6(1). 2006.

RITTER, L.M.O.; MORO, R.S. **As bases epistemológicas da ecologia da paisagem**. Journal of Biotechnology and Biodiversity, n. 3(3). 2012

RIZZINI, Carlos Toledo. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1971.

ROCHELLE, A.L.C., CIELO-FILHO, R. & MARTINS, F.R. **Tree community structure in an Atlantic forest fragment at Serra do Mar State Park, southeastern Brazil**. Biota Neotrop. 11(2). 2011. Access on line:  
<http://www.biotaneotropica.org.br/v11n2/en/abstract?inventory+bn02711022011>.

RODRIGUES, W.A. **Revisão Taxonômica das espécies de *Virola Aublet* (Myristicaceae) do Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas / UNICAMP. vol. I e II. 1980.

RODRIGUES, W.A. **Notas taxonômicas sobre Myristicaceae neotropicais.** Acta Biol. Par., Curitiba, 31 (1, 2, 3, 4): 71-77. 2002.

RUSSO, S.E.; AUGSPURGER, C.K. **Aggregated seed dispersal by spider monkeys limits recruitment to clumped patterns in *Virola calophylla*.** Ecology Letters, n. 7(11), 1058-1067. 2004. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2004.00668.x

RUSSO, S.E. **Responses of dispersal agents to tree and fruit traits in *Virola calophylla* (Myristicaceae): implications for selection.** Oecologia, n. 136(1), 80-87. 2003.

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

SAMBUICHI, R. H. R. **Estrutura e dinâmica do componente arbóreo em área de cabruca na região cacauzeira do sul da Bahia, Brasil.** Acta bot. bras, v. 20, ano 4. 2006.

SAUQUET, H. **Androecium diversity and evolution in Myristicaceae (Magnoliales), with a description of a new Malagasy genus, *Doyleanthus* gen. nov.** American journal of botany, n. 90(9), 1293-1305. 2003.

SILVA, J.A.C.da; SILVA, M.F. da. **Estudos florísticos no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil – II: famílias Myristicaceae, Siparunaceae e Monimiaceae.** Amazônia. Acta Amazonica. Vol.38 (2), p.207-212. 2008.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. **Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic forest of northeast Brazil.** Nature 404, p. 72-74. 2000.

SMULDERS, M. J. M.; VAN DER SCHOOT, J.; ARENS, P.; VOSMAN, B. **Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.).** Molecular Ecology Notes, n. 1(3), p. 188-190. 2001.

SOANE, C.E.S.; DIAZ, V.S.; SANTOS, T.L.; FROUFE, L.C.M. **Corredores ecológicos como ferramenta para desfragmentação de florestas tropicais.** Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo, v.30, n. 63, p. 207-216, ago./out. 2010. doi: 10.4336/2010.pfb.30.63.207

SOLÓRZANO, A.; DE OLIVEIRA, R. R. **Geografia, História e Ecologia: criando pontes para a interpretação da paisagem.** Ambiente & Sociedade, n. 12(1), p. 49-66. 2009.

SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, Instituto de Pesquisas Ecológicas, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SEMAD/Instituto Estadual de Florestas-MG. MMA/SBF, Brasília, DF, Brasil. 2000.

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M.C.; HIROTA, M.M.; BEDÊ, L.C. **Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica**

**brasileira**. Megadiversidade, 1(1),132-138.2005.  
[http://cncflora.jbrj.gov.br/plataforma2/arquivos/biblio/4ff5c8795f18c\\_18\\_Tabarelli\\_et\\_al.pdf](http://cncflora.jbrj.gov.br/plataforma2/arquivos/biblio/4ff5c8795f18c_18_Tabarelli_et_al.pdf)  
Acesso em 14 de Abril de 2013

TAKHTAJAN, A.L. **Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta)**. The botanical review, 46(3), 225-359. 1980.

Access on line:

<http://books.google.com.br/books?hl=en&lr=&id=oumyfO-NHuUC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Takhtajan&ots=iLdAR9Evv1&sig=KQAlj9-ENzxZt7QDIBhWwEENvxvE#v=onepage&q=Takhtajan&f=false>

THIEN, L. B.; BERNHARDT, P.; DEVALL, M. S.; CHEN, Z.; LUO, Y.; FAN, J.; YUAN, L.; WILLIAMS, J. H. **Pollination biology of Basal Angiosperms (Anita Grade)**. American Journal of Botany, v. 96, n. 1, p. 166-182, 2009.

TURNER, M.G. **Spatial and temporal analysis of landscape patterns**. Landscape Ecology, vol. 4, no. 1, p. 21-30. 1990. Access on line:

[http://download.springer.com/static/pdf/800/art%253A10.1007%252F02573948.pdf?auth66=1353865878\\_ed2891de91eb15952c410ee8a2bdc004&ext=.pdf](http://download.springer.com/static/pdf/800/art%253A10.1007%252F02573948.pdf?auth66=1353865878_ed2891de91eb15952c410ee8a2bdc004&ext=.pdf)

VALLE, G. D.; ZUCCHI, M. I.; STABELLINI, N. S.; LOURENÇÃO, A. L.; PINHEIRO, J. B. **Estrutura genética populacional de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) utilizando marcadores microssatélites**. Neotropical Entomology, n. 40(2), p. 204-211. 2011.

VEKEMANS, X.; HARDY, O.J. **New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations**. Molecular Ecology, n. 13, p. 921-935. 2004. doi: 10.1046/j.1365-294X.2004.02076.x

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. **Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais**. Série técnica IPEF, v. 12, n. 32, p. 25-42, 1998.

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

ZUCKERBERG, B.; PORTER, W.F. **Thresholds in the long-term responses of breeding birds to forest cover and fragmentation**. Biological Conservation, n. 143, p. 952-962. 2010.

WRIGHT, S. **The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating**. Evolution, 395-420. 1965. Acesso em 14 de Abril de 2012.



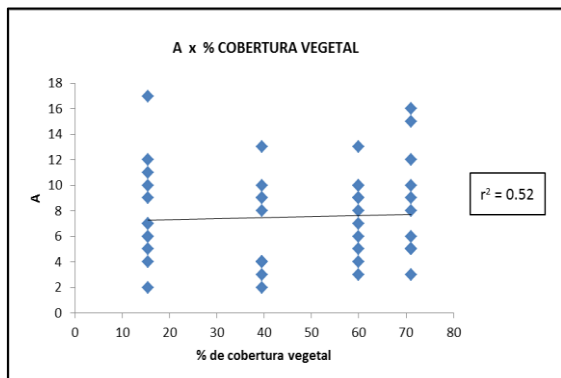
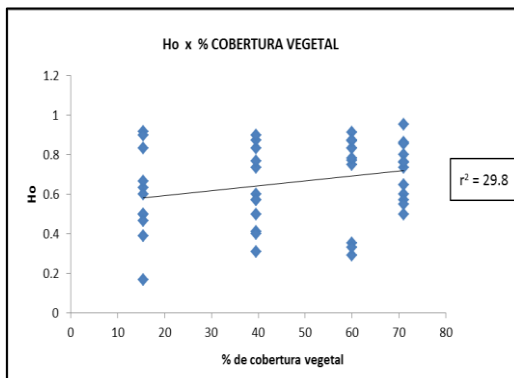
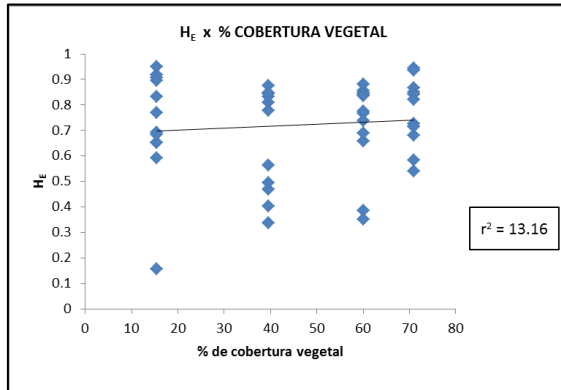
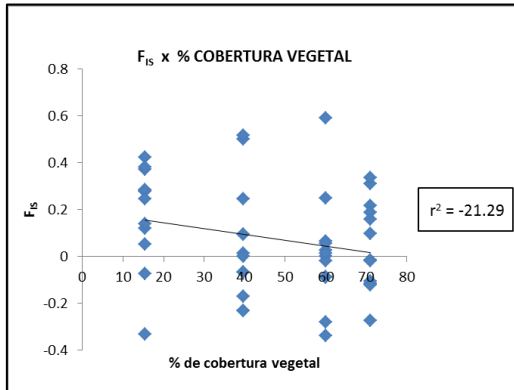
*Delm.*  
1841.72

Anexos



## ANEXO I

Análises preliminares de regressão entre os parâmetros genéticos - eixo Y ( $F_{IS}$ ,  $H_E$ ,  $H_o$ ,  $A$ ) e a porcentagem de cobertura florestal - eixo X. Valores de  $r^2$  inseridos em destaque ao lado cada gráfico.



## ANEXO II

Gráficos de tendência entre a menor e a maior porcentagem de cobertura florestal e cada um dos locos microssatélites utilizados no estudo. A direita, acima = nome do loco microssatélite. A esquerda, acima = parâmetro genético versus porcentagem de cobertura florestal ( $F =$  índice de fixação /  $H_E =$  heterozigosidade esperada /  $H_O =$  heterozigosidade observada /  $A =$  número de alelos)

