

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR



**ESTRUTURA GENÉTICA E FLUXO GÊNICO EM *Caesalpinia*
echinata (PAU-BRASIL) POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

SÔNIA CRISTINA OLIVEIRA MELO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2005

SÔNIA CRISTINA OLIVEIRA MELO

ESTRUTURA GENÉTICA E FLUXO GÊNICO EM *Caesalpinia echinata* (PAU-
BRASIL) POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

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

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2005

SÔNIA CRISTINA OLIVEIRA MELO

ESTRUTURA GENÉTICA E FLUXO GÊNICO EM *Caesalpinia echinata* (PAU-BRASIL) POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

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

Aprovada: 19 de julho de 2005

Prof. Dra. Fernanda Amato Gaiotto
UESC

Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho
UFG

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
UESC – Orientador

Ao Dorival, por estar presente na minha vida,
OFEREÇO.

Aos meus pais, irmãos e minha avó
(*in memmorian*), pelo apoio,
confiança, incentivo e,
principalmente paciência,
DEDICO.

Agradecimentos

Definitivamente, dissertação não é um trabalho individual, muito menos fácil. Exige dedicação e persistência!

Durante o tempo que estive me dedicando a esta difícil tarefa, muitas foram as pessoas que estiverem me ajudando, seja direta ou indiretamente.

Gostaria de agradecer a todos, em especial:

Ao Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa, pelo incentivo desde o início da minha carreira científica, pela participação e orientação em muitas etapas e decisões, pela calma e paciência ao lidar com os problemas e pelo exemplo de profissionalismo. Obrigada pelo apoio científico! Obrigada pela amizade e confiança! Obrigada pelos ensinamentos (incluindo as correções gramaticais)! Obrigada, pela oportunidade de aprendizado! Obrigada por ter sido o meu orientador.

A Profa. Dra. Fernanda Amatto Gaiotto, pela orientação, pela ajuda fundamental na realização deste trabalho. Obrigada pelo suporte científico, pelos ensinamentos repassados com generosidade e paciência! Obrigada por ter-me apresentado a genética de populações! Obrigada pelo apoio estatístico! Obrigada pela atenção e amizade! Você foi uma pessoa imprescindível nesta etapa.

Ao Dr. José Luiz Bezerra pelo incentivo e auxílio prestados durante o início deste trabalho;

Aos Professores Marcelo Mielke, Maurício Moreau e Delmira Costa, pela colaboração na obtenção de dados e discussões de resultados;

À Profa. Dra. Mônica Rosa Bertão, pelo trabalho prestado para a coordenação desta pós-graduação e, acima de tudo, pela amizade e pelo companheirismo;

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Costa, pelo trabalho desenvolvido na coordenação deste mestrado e pela amizade;

Ao Prof. Dr. Leandro Lopes Loguércio, pelos conhecimentos repassados, pela amizade e pelas sessões de análises (foram importantes). Obrigada!

Ao pessoal da Reserva Serra do Teimoso, que nos acolheram com disposição para as coletas de amostras; em especial, Val e Chicão, pelo apoio no campo;

Ao pessoal da Estação Ecológica do Pau-Brasil, que nos permitiu amostrar árvores de longa data, e ainda, pelo auxílio no campo;

Aos amigos Frank e Fabrício, que por várias vezes estiveram comigo em coletas de campo que, apesar de cansativas, foram acima de tudo, divertidas e inesquecíveis. Obrigada pelo apoio, vocês foram essenciais nesta etapa;

Ao seu Brasilino (Brás), pelo trabalho de campo realizado com sabedoria e, acima de tudo, pela competência;

Aos colegas de mestrado, que foram mais do que colegas, foram amigos e verdadeiros companheiros, principalmente, Maíza, Stênio, Dine, Alayne, Rita, Van, Dahy e Dorival;

Em especial, ao Dorival, que de colega de mestrado se tornou uma pessoa fundamental na minha vida. Obrigada pela amizade, pelo apoio, incentivo, aprendizado e pela dedicação. É muito difícil agradecer por tudo que tem feito na minha vida, mas... obrigada, principalmente pelo suporte pessoal e emocional!

A todos os Professores que, indiretamente, estavam envolvidos: Acássia, Júlio, Márcio, Priminho, Abelmon (sempre questionando sobre a pesquisa);

A todos os colegas de laboratório (Robson, Andréa, Fernandinha, Joci), pelo convívio, pela amizade, pela paciência e pelo incentivo nos dias de desânimo;

À Fernandinha, a princípio, uma colega de trabalho (iniciação científica), hoje uma grande amiga e companheira;

Aos colegas do grupo do pau-brasil, que me auxiliaram em tudo: Jeiza, Ivine e Fabrício. Obrigada principalmente pela ajuda inestimável na parte técnica.

À Andréa e Geysa, pelo empenho e profissionalismo exercidos junto à secretaria deste mestrado;

À UESC, ao CNPq, à FAPESB e à Fundação Biodiversitas / CEPAN pelo suporte financeiro;

Aos meus pais, Fernando e Marlene e irmãos, Fernanda e Leandro, por estarem sempre me incentivando, dando apoio e conforto nas horas difíceis, obrigada!

A Deus, por ter me dado coragem suficiente para encarar este mestrado e força necessária para chegar até aqui.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Características da espécie.....	4
2.1.1. Aspectos ecológicos e botânicos	4
2.1.2. Importância sócio-econômica.....	10
2.2. Marcadores genético-moleculares	11
2.2.1. Marcadores microssatélites.....	14
2.3. Conservação da biodiversidade.....	17
2.3.3. Estratégias de conservação <i>ex situ</i>	19
2.3.2. Estratégias de conservação <i>in situ</i>	20
2.3.3. Ameaças à diversidade genética	21
2.4. Conseqüências do isolamento populacional.....	22
2.5. Variabilidade e estrutura genética de populações	25
2.6. A dinâmica do fluxo gênico	27
3. METODOLOGIA.....	30
3.1. Caracterização da área de coleta do material vegetal de <i>C. echinata</i>	30
3.2. Extração de DNA genômico de <i>C. echinata</i>	31
3.3. Padronização e amplificação com os <i>primers</i> microssatélites	32
3.5. Análises genético-estatísticas.....	33
4. RESULTADOS	36
4.1. Caracterização das populações.....	36
4.2. Extração do DNA genômico.....	37
4.3. Caracterização dos locos microssatélites	38
4.3. Estrutura genética.....	41
4.4. Análise de parentesco	44
5. DISCUSSÃO	46

5.1. Os locos microssatélites	46
5.2. Estrutura genética.....	48
5.3. Tamanho efetivo populacional	53
5.4. Análise de parentesco	54
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

EXTRATO

MELO, Sônia Cristina Oliveira, M.Sc., Universidade Estadual de Santa Cruz, julho de 2005. **Estrutura Genética e Fluxo Gênico em *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) por Meio de Marcadores Microssatélites**. Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadores: José Luiz Bezerra e Fernanda Amato Gaiotto.

O pau-brasil é uma espécie ameaçada de extinção e, apesar de incluído em projetos conservacionistas, carece de informações ecológicas e genéticas que possam corroborar com essas iniciativas. Para a análise genética, os marcadores moleculares são recomendados, principalmente aqueles com alto conteúdo de informação por loco como os microssatélites. O presente trabalho representa a primeira aplicação de um grupo de marcadores microssatélites nucleares recentemente desenvolvidos para o pau-brasil. Foram analisados a estrutura genética e o fluxo gênico em duas populações naturais de pau-brasil, localizadas em fragmentos de Mata Atlântica do Sul da Bahia, visando gerar subsídios para a conservação genética. A amostragem consistiu de 242 indivíduos, sendo 54 adultos da população da Estação Ecológica Pau-Brasil, Porto Seguro, BA, e 44 adultos e 144 plântulas da Reserva Particular do Patrimônio Nacional Serra do Teimoso, Jussari, BA. Dez dos 26 *primers* microssatélites previamente desenhados foram caracterizados e apresentaram, em média, 11,6 alelos por loco, nos 98 indivíduos adultos. As duas populações apresentaram alta heterozigosidade gênica ($H_e = 0,59$ na ESPAB e $H_e = 0,63$ na S. Teimoso), porém revelaram um excesso de homozigotos ($H_o = 0,24$ na ESPAB e $H_o = 0,53$ na S. Teimoso), provavelmente causados por endogamia, principalmente na população da ESPAB ($F_{IS} = 0,59$), onde este índice é excepcionalmente alto e significativamente diferente de zero (intervalo de confiança a 95%). O coeficiente de coancestralidade ($F_{ST} = 0,313$; $R_{ST} = 0,262$)

foi superior ao esperado para famílias de irmãos completos ($F_{ST} = 0,25$), indicando que os indivíduos dentro das populações são proximamente relacionados. Ao mesmo tempo, estes índices indicam que está ocorrendo forte estruturação genética entre as populações analisadas. A taxa de fluxo gênico aparente entre as populações ($Nm < 1$) foi baixa, evidenciando ocorrência de isolamento das populações e uma restrita movimentação gênica entre elas, aumentando as chances de ocorrer deriva e endogamia. Com base na estrutura genética estimada, o tamanho efetivo para estas populações indicou a necessidade de conservar *in situ* 262 populações, de modo a assegurar um tamanho efetivo de 500 indivíduos e a conservar os alelos detectados nessas populações. Na S. Teimoso, constatou-se a existência alta diversidade gênica nos dois estádios analisados ($H_e = 0,63$ nos adultos e $H_e = 0,74$ nos regenerantes). O índice de coancestralidade ($F_{ST} = 0,15$) foi superior ao encontrado em populações de meio-irmãos ($F_{ST} = 0,125$), o que sugere uma estreita relação de parentesco entre eles. A heterozigosidade observada nos adultos ($H_o = 0,53$) foi superior ao encontrado nas progênies ($H_o = 0,37$), indicando uma provável seleção contra homozigotos no estádio adulto, provavelmente por causa do sucesso evolutivo dos heterozigotos. Uma análise de parentesco entre os indivíduos da S. teimoso detectou que 15 dos 144 plântulas tiveram uma probabilidade de maternidade-paternidade (PM-P) superior a 80% de ter o progenitor identificado dentro do conjunto dos adultos genotipados. Os resultados confirmam a existência de fluxo gênico intrapopulacional com alguns regenerantes que se dispersaram a distâncias superiores a 1 km das árvores-genitoras, seja por pólen ou por dispersão de sementes. Além disso, acredita-se que os regenerantes que não tiveram o genitor identificado, possivelmente são oriundos de um banco de plântulas formado a partir de indivíduos de gerações anteriores. Embora se tenha encontrado uma grande diversidade genética, por causa deste isolamento populacional, a riqueza alélica está sendo perdida por efeitos de deriva e endogamia. Assim, a fim de elaborar estratégias eficientes de conservação da espécie, deve-se considerar a necessidade de preservar um grande número de populações, introduzir corredores ecológicos, e criar novas unidades de conservação *in situ* e *ex situ*, de modo a permitir a troca de alelos e evitar a erosão genética da espécie.

Palavras-chave: genética de populações, conservação genética, Mata Atlântica, análise de parentesco, SSR, marcadores moleculares.

ABSTRACT

MELO, Sônia Cristina Oliveira, M.Sc., State University of Santa Cruz, July of 2005.
Genetic Structure and Gene Flow in Populations of *Caesalpinia echinata* (Brazilwood) by means of Microsatellites Markers. Adviser: Ronan Xavier Corrêa.
Committee Members: José Luiz Bezzera and Fernanda Amato Gaiotto.

Brazilwood is a tree species threatened to extinction which lacks ecological and genetical information, even though it is encompassed in conservation programs. For genetic analysis, molecular markers are recommended, mainly those with high content of information like the genomic microsatellites. These markers have been recently developed for brazilwood, and the present work represents the first application of them in genetic-population analyses. Thus, the diversity, the genetic structure, and the gene flow in two natural populations of brazilwood, located in Atlantic forest fragments at Southern Bahia State, were analyzed based on microsatellites markers, aiming to generate informations for genetic conservation of this species. A sample of 242 individuals were analyzed, 54 of them from the population of Estação Ecológica Pau-Brasil (ESPAB), Porto Seguro, BA, and 44 adults and 144 seedlings from the Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra do Teimoso, Jussari, BA. Ten of the 26 microsatellites primers previously designed were characterized and presented, in average, 11,6 alleles for locus in 98 adult individuals, with alleles ranging from 90 to 290 bp. The two populations presented a high expected heterozygosity ($H_e = 0.59$ in the ESPAB and $H_e = 0.63$ in the S. Teimoso), however they revealed a trend to the excess of homozygous ($H_o = 0.24$ in the ESPAB and $H_o = 0.53$ in the S. Teimoso), probably because of inbreeding, mainly in the population of the ESPAB ($F_{IS} = 0.59$) that it is rather high and significantly different of zero (confidence interval 95%). The differentiation between them ($F_{ST} = 0.313$; $R_{ST} = 0.262$) was superior to the expected for families of full-sibs (0.25), meaning that the

individuals have a great coancestry. The apparent gene flow ($Nm < 1$) was low, suggesting isolation of populations and a restricted gene flow between them. The low gene flow can increase the genetic drift and inbreeding. On the basis of the population structure estimation, the population effective size estimated for these populations indicated the necessity to conserve 262 populations in situ, in order to assure a population effective size of 500 individuals and the conservation of the alleles detected in the two natural populations. Intrapopulation analysis in the S. Teimoso, evidenced the existence of a high level of gene diversity in the two analyzed stages ($H_e = 0.63$ in the adults and $H_e = 0.74$ in the seedlings). The differentiation among them ($F_{ST} = 0.15$) was superior to that found in populations of half-sibs ($F_{ST} = 0.125$), which suggests the existence of individuals closer related than half-sibs. The heterozygosity observed in adults ($H_o = 0.53$) was superior to that found in seedlings ($H_o = 0.37$), indicating the existence of selection against homozygous in the adult stage, probably because of the fitness related to the heterozygotes. A maternity analysis among the individuals of the S. Teimoso detected that 15 from 144 seedlings had a probability of maternity (PM) higher than 80% to have the ancestor identified in the set of the analyzed adults. Considering that seedlings were collected near to the supposed tree-mother, the results likely identified the probable biological mother; however, the seedlings with established maternity not always were situated near to mother. The results showed that intrapopulation gene flow exists and that the population does not form a family structure, since seedlings were found at distances superior to 1 km from tree-mothers. Moreover, the seedlings that did not have the maternity identified are likely from a bank of seedlings made of individuals from previous generations that left descendants. Although the species presents a great genetic diversity, the allele wealth has been lost by effect of drift and inbreeding due the isolation of population. Thus, in order to elaborate efficient strategies of conservation of the species, the necessity to conserve a great number of populations and to introduce ecological corridors should be considered, aiming to allow the exchange of alleles, contributing to prevent the genetic erosion of species.

Key-words: populations genetics, conservation genetics, atlantic forest, maternity test, SSR, molecular markers.

1. INTRODUÇÃO

As florestas tropicais estão incluídas entre os ecossistemas mais ricos em espécies do planeta que, pela alta taxa de desmatamento e degradação de seus ambientes, têm sofrido a perda de inúmeras espécies da fauna e flora, pela redução da área de ocorrência e pelo isolamento dos habitats originais (WILSON, 1997; TABARELLI et al., 1999). Considerando a Mata Atlântica, esta foi reduzida a pequenos trechos, restando apenas 6% da sua área original na forma de fragmentos florestais (THOMAS, 2001). Por causa dessa degradação, ela se encontra em estado crítico, sendo considerada uma das grandes prioridades para conservação da biodiversidade em todo continente americano (WILSON, 1997).

A fragmentação florestal reduz o tamanho e aumenta o isolamento espacial das populações naturais (YOUNG et al. 1996). Como consequência, há perda de diversidade genética e alterações na estrutura populacional. As populações remanescentes sofrem efeitos adversos, principalmente da deriva genética e da endogamia, que influenciam os níveis de diversidade genética e sua distribuição. Por outro lado, a movimentação gênica, fator responsável por homogeneizar as populações, fica seriamente comprometida (BALLAL et al., 1994). Assim, estes fragmentos de matas não conseguem sustentar populações mínimas viáveis, aumentando o risco de erosão genética das espécies (TABARELLI et al., 1999). Neste contexto, a determinação das consequências genéticas dos remanescentes florestais é uma prioridade para formular estratégias de conservação (WHITE et al., 1999).

Dentre as espécies que habitam fragmentos florestais de Mata Atlântica, tem-se o pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). Relatos históricos demonstram que a espécie distribuía-se amplamente durante o último período glacial. No entanto, com o fim da época seca e fria, o pau-brasil formou blocos e, desde então, mantém-se

isolado em ambientes mais secos da paisagem (CUNHA; LIMA, 1992). Adicionalmente, a espécie foi intensamente explorada durante o período colonial (BUENO, 2002), desencadeando o isolamento das árvores remanescentes e resultando em uma pequena escala de multiplicação natural da espécie. Por isso, em 1992, o pau-brasil foi classificado como “em perigo” de extinção pelo IBAMA. Entretanto, as últimas populações naturais de pau-brasil, que segundo Cardoso et al. (1998), encontram-se em fragmentos remanescentes e em algumas reservas nos Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, carecem de informações ecológicas e genéticas que possam corroborar para manutenção da sua variabilidade genética. Antes de submeter a espécie às estratégias de conservação, é indispensável entender a sua dinâmica populacional.

Dessa forma, informações genéticas da espécie são de extrema importância para permitir a elaboração de estratégias eficientes de conservação. Uma das maneiras mais eficazes para obter essas informações de populações naturais consiste no emprego de marcadores moleculares, principalmente os de altos níveis de polimorfismo (OUBORG et al., 1999). No caso do pau-brasil, marcadores RAPD e Microsatélites cloroplastídicos foram empregados em estudos populacionais (CARDOSO et al., 1998; LIRA et al., 2003). No entanto, são necessários novos estudos de modo a incluir marcadores mais informativos. Dentre os marcadores moleculares disponíveis, os microsatélites são os mais eficientes para gerar dados que permitam formular estratégias de conservação. Eles têm sido utilizados em estudos de populações naturais (COLLEVATTI et al., 1999; AL-RABAB'AH; WILLIAMS, 2002) e são altamente polimórficos quando comparados com outras classes de marcadores. Estes marcadores são constituídos de locos geneticamente variáveis, multialélicos e de grande conteúdo informativo (LITT; LUTY, 1989; GUPTA et al., 1996; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Isso os tornam ideais para estudos genéticos populacionais (OUBORG et al., 1999). Os primeiros *primers* microsatélites nucleares de pau-brasil foram recentemente desenvolvidos por Rosana Brondani Collevatti (comunicação pessoal), não havendo estudos populacionais desenvolvidos com esses marcadores.

Neste contexto, foram analisados a estrutura genética e o fluxo gênico de duas populações naturais de pau-brasil, localizadas em fragmentos de Mata Atlântica do Sul da Bahia, com base em marcadores microsatélites, visando gerar subsídios para a conservação genética. Os objetivos específicos foram:

1. Estabelecer as condições de amplificação para finalizar o desenvolvimento dos *primers* para regiões microssatélites previamente caracterizadas para pau-brasil (Rosana Brondani Collevatti).
2. Caracterizar o estado de conservação e estimar o tamanho efetivo de duas populações naturais de pau-brasil, localizadas na Estação Ecológica Pau-Brasil, Porto Seguro, e na Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra do Teimoso, Jussari, BA.
3. Estimar parâmetros de diversidade genética e avaliar sua distribuição em duas populações naturais fragmentadas de *C. echinata*.
4. Estimar o fluxo gênico dentro de uma população natural por método direto (teste de paternidade) e entre populações pelo método indireto (F_{ST}).
5. Comprovar numericamente a necessidade de conservar a espécie e sugerir estratégias de conservação para estabelecimento da espécie em reservas naturais e coleções *ex situ*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características da espécie

2.1.1. Aspectos ecológicos e botânicos

Descrito por Lamarck em 1785 como *Caesalpinia echinata*, o pau-brasil é uma espécie de angiosperma nativa da Mata Atlântica, um dos ecossistemas de maior diversidade biológica e genética, no entanto, um dos mais frágeis do planeta (LIMA, 2002). Por causa da alta diversidade florística, a Mata Atlântica está incluída entre os cinco maiores ecossistemas do mundo, em número de espécies, sendo considerado um “hot spot” de biodiversidade (JOLY et al., 1999). Porém, muito do que resta desse ecossistema são fragmentos de florestas, a maioria deles de tamanho reduzido, que não sustentam mais populações mínimas viáveis de espécies vegetais e animais que garantam sua sobrevivência a longo prazo. Porém, do ponto de vista ecológico, esses fragmentos são fontes de informações biológicas para a restauração da paisagem e para conservação da fauna e da flora. Há evidências de que a maior diversidade biológica ocorre entre o sul da Bahia e o norte do Espírito Santo, um trecho da costa brasileira que tem sido apontado como um dos maiores centros de diversidade desse ecossistema (TABARELLI et al. 1999; THOMAS, 2001).

Incluída na família Leguminosae, e pertencente à subfamília Caesalpinioidea, o pau-brasil distribuía-se amplamente ao longo da costa atlântica brasileira no trecho entre o Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro, em áreas conhecidas como “mata

seca” ou “mata de tabuleiro”, antes da colonização portuguesa (LIMA, 1992). Após anos de exploração, o pau-brasil tornou-se uma relíquia da época colonial, ficando reduzido a pequenos fragmentos de mata. Nos últimos 10 anos, foram constatadas ocorrências de populações remanescentes nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (LIMA, 1992). Mais recentemente, Cardoso et al. (1998) relataram que a espécie foi reduzida a pequenos remanescentes concentrados em maior abundância no Sul do estado da Bahia. Em 2004, Rocha observou que a espécie ainda é encontrada nos Estados do Rio de Janeiro, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Bahia. Além da sua redução populacional, a espécie ainda sofre com a constante degradação de seu habitat natural, a Mata Atlântica. Por se concentrar nas áreas mais populosas do Brasil, a Mata Atlântica está sob fortes efeitos de destruição associada ao crescimento urbano (MELLO-FILHO, 1991/1992; CARDOSO et al., 1998). Neste contexto, o pau-brasil é uma das espécies classificadas desde 1992 como “em perigo” de extinção (IBAMA, 1992). Rocha (2004), após realizar um levantamento sobre a distribuição da espécie, relatou que ela ainda requer medidas de conservação, plantio e divulgação, pois não possui representatividade suficiente capaz de retirá-la da lista de espécies ameaçadas de extinção.

Segundo Lima (2002), o porte dos exemplares atuais é de 10 a 12 m de altura, tendo sido registrado indivíduos com até 30 m nos tempos da colonização portuguesa. A copa é bastante irregular, com tendência a se tornar circular, repleta de galhos em sua maioria ascendente e de tom cinza-claro nas terminações (Figura 1). Os ramos mais novos e as cascas de espécimes mais jovens são providos de acúleos.

Como uma típica leguminosa, a espécie apresenta frutos deiscentes do tipo legume que se abrem um mês após a floração, os quais produzem de uma a quatro sementes (Figura 2b). As flores são hermafroditas, pentâmeras, com uma pétala que se destaca das demais por sua coloração, cuja função está diretamente relacionada com a atração de polinizadores (JUDD et al., 1999; TUCKER, 2003). As folhas bipartidas são compostas e bipenadas, com 3 a 10 pinas e, em cada pina, 3 a 21 folíolos. No caso do pau-brasil, constatou-se a existência de populações com folhas cujas pinas e folíolos, embora mais numerosos, são menores e o lenho freqüentemente possui tonalidade castanho-alaranjada. Esse é o grupo mais comum

encontrado em vários trechos da costa atlântica, desde o Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro (LIMA, 2002).

Por outro lado, em algumas regiões do litoral da Bahia e do Espírito Santo, foram observadas populações com pinas e folíolos menos numerosos, porém maiores e com um lenho laranja-avermelhado. Exemplares assim eram conhecidos apenas em cultivo, na Reserva Biológica de Sooretama (ES), no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e na Estação Pau-Brasil de Porto Seguro, BA (LIMA, 2002). No entanto, em um projeto desenvolvido pela CEPLAC, algumas amostras foram coletadas no Sul da Bahia, as quais se encontram mantidas no herbário da CEPLAC. Da mesma forma, uma terceira variante morfológica que possui folíolos largos e cujo lenho é muito escuro, com uma intensa coloração vermelha enegrecida, foi observada na região do vale do rio Pardo, no município de Potiraguá, BA (Fabrício Sacramento Juchum, comunicação pessoal).

Essas variações na morfologia das folhas e na coloração do cerne sustentam a hipótese de que existem diferenciações relacionadas com a idade, com o tipo de ambiente no qual a árvore se desenvolve bem como aos aspectos genéticos da espécie. Alguns estudos prévios parecem indicar que a localização geográfica, por exemplo, é um dos fatores relacionados com a dureza e a coloração do lenho, tal como o formato, a disposição e o número de folhas (LIMA, 2002). No entanto, de posse das amostras coletadas recentemente em Potiraguá, BA, visto que foram encontrados os três tipos morfológicos em uma mesma área, esses materiais foram submetidos a estudos de filogenia com base no DNA a fim de avaliar as possíveis diferenciações foliares (JUCHUM et al., 2005).

O tronco, segundo Rizzini (1971) varia entre 30 e 50 cm de diâmetro a altura do peito (DAP), raras vezes atingindo 70 cm em exemplares nativos. O tronco que se apresenta irregular, possui tendência de se ramificar desde cedo. Na base do tronco é comum haver reentrâncias ou pequenas expansões, comumente chamadas de sapopemas. A casca geralmente apresenta coloração acinzentada, embora nas árvores adultas, após o desprendimento de placas irregulares, surjam manchas castanho-avermelhadas bem características por toda a superfície do tronco (LIMA, 2002). No interior do tronco das árvores jovens predomina o alborno, uma parte mais clara e menos densa. Na parte mais interna do lenho encontra-se o cerne, de coloração avermelhada que geralmente só aparece depois que as árvores já têm mais de dez anos de idade (LIMA, 2002).

A madeira do pau-brasil é muito dura e pesada, com a coloração do cerne variando do castanho-alaranjado ao castanho-avermelhado e às vezes chegando ao vermelho-escuro, de uma tonalidade semelhante à do vinho tinto. Após o corte, com a exposição ao ar, o cerne torna-se mais escuro, diferenciando-se nitidamente do alborno esbranquiçado que constitui a parte mais jovem e externa do lenho (MAINIERI, 1960; LIMA, 2002).

É importante salientar que o pau-brasil é uma espécie de crescimento lento, embora também existam diferenças relacionadas com a região e com o fato de se tratar de uma planta cultivada ou de um exemplar nativo (Figura 1). Alguns estudos realizados em fragmentos florestais do estado do Rio de Janeiro sugerem que as taxas de sobrevivência e de mortalidade das plântulas variam conforme as condições naturais. Locais onde a disponibilidade de luz é mais alta, como clareiras ou trechos impactados nos bordos da floresta, revelam taxa de mortalidade menor e maior número de plântulas. Isso é um indício de que a intensidade da luz em alguns lugares mais abertos da floresta exerce influência positiva nas taxas de crescimento do pau-brasil (LIMA, 2002). Estas informações são de extrema importância para a reintrodução da espécie em novas áreas, uma vez que se encontra “em perigo” de extinção e sua conservação *in situ* requer o conhecimento adequado para obter êxito nos programas de plantio de pau-brasil.



Figura 1: Pau-brasil no *campus* da UESC. Com 15 anos de idade, na mata em regeneração (esquerda); com 15 anos, a sol pleno (direita superior); com 3 anos, paisagismo (direita inferior).

As árvores em cultivo florescem predominantemente pela primeira vez entre três e quatro anos de idade enquanto que, em populações naturais, a floração raras vezes foi observada em plantas com menos de dez anos. O tipo de estratégia de floração é supra-anual, ou seja, a produção de flores numa mesma árvore costuma ocorrer em intervalos superiores a um ano. As flores são efêmeras e, após a antese, permanecem abertas por apenas 12 a 24 horas. Tal estratégia possivelmente está relacionada com o alto custo energético desse fenômeno biológico em árvores que precisam se adaptar a ambientes tropicais (LIMA, 2002).

As flores, suavemente perfumadas, ocorrem em pequenos cachos terminais, raramente brotando nas axilas dos ramos (AGUIAR; PINHO, 1996; LIMA, 2002). O cálice, de cor verde-amarelada, de início envolve todas as peças florais e depois, na fase fértil, abre-se em cinco lobos reflexos. As pétalas possuem uma intensa coloração amarela, com leves nuances avermelhadas na porção basal. A pétala mediana destaca-se das demais pela presença de uma mancha central vermelho-escura que se espalha por quase toda a sua superfície (Figura 2 a). Essa característica está associada à estratégia reprodutiva de várias espécies de plantas e talvez funcione como um sinalizador de néctar para os agentes polinizadores (LIMA, 2002; ZAIA, 2004).

Cerca de um mês após a floração, o pau-brasil frutifica. O início da floração coincide com o final da época da seca, pois os botões florais freqüentemente aparecem após as primeiras chuvas abundantes. É bem provável que as variações na temperatura e nos índices pluviométricos exerçam um efeito determinante no rompimento da dormência das gemas florais, particularmente no caso do pau-brasil, que manifesta clara preferência por ambientes mais secos (LIMA, 2002). De 30 a 40 dias mais tarde, os frutos amadurecem e dispersam as sementes. O período de frutificação é muito curto: no máximo, de dez a 15 dias entre a abertura das primeiras flores e o início da frutificação. Tanto a floração como a frutificação ocorrem em épocas diversas nos diferentes locais: no Sudeste, a espécie costuma florescer entre setembro e outubro, enquanto no Nordeste o pico da floração ocorre entre outubro e novembro (LIMA, 2002). Cada fruto desenvolve de uma a quatro sementes, irregularmente orbiculares e de coloração acastanhada. No momento da

abertura das valvas, as sementes são dispersas até 4 a 5 metros de distância da árvore mãe (LIRA et al., 2003), e começam a germinar cerca de quatro ou cinco dias mais tarde, quando se formam as plântulas com as primeiras folhas compostas de seis a dez folíolos (LIMA, 2002).

As sementes de pau-brasil comportam-se como ortodoxa, ou seja, não só toleram a dessecação, mas, provavelmente, dependem desse processo para redirecionar seu caminho metabólico em direção à germinação. No caso do pau-brasil, as sementes toleram dessecação até atingir 7,6% de água, o que pode facilitar o armazenamento e ampliar o potencial de conservação, para fins de reposição das populações naturais. Sob temperatura baixa, 80% das sementes germinam quando armazenadas por até 18 meses (BARBEDO et al., 2002).

O sistema de polinização não é conhecido detalhadamente, mas outras espécies do gênero *Caesalpinia* são polinizadas por abelhas carpinteiras (LEWIS; GIBBS, 1999), o que permite sugerir, associando a cor, o tamanho, e a morfologia de suas flores (Figura 2 a), que a polinização do pau-brasil também ocorra por essa espécie. Analisando a morfologia floral, Zaia (2004) constatou que a espécie realmente apresenta características capazes de atrair polinizadores. Lira et al. (2003) observaram uma proporção de dispersão de 6,7 de pólen para 1 de sementes, obtida por marcadores RAPD, constatando a baixa dispersão das sementes o que foi explicado pela curta distância alcançada por estas, e evidenciando que o mecanismo de polinização é a forma mais eficiente de dispersão. Além disso, acredita-se que os acúleos que envolvem os legumes funcionam como um fator que inviabiliza a dispersão secundária das sementes, visto que evita que possíveis predadores, como periquitos e maritacas, possam utilizá-la como alimento e, conseqüentemente, dispersar suas sementes (LIMA, 2002). A ausência desses mecanismos secundários de dispersão restringe a distribuição da espécie, permitindo sugerir que ela seja espacialmente agregada.

O sistema reprodutivo ainda não foi estudado detalhadamente, mas em comum com outras espécies do gênero e segundo estudos de desenvolvimento floral realizado por Zaia (2004), acredita-se que a espécie seja alógama, visto que a flor (Figura 2a) apresenta uma pétala característica que favorece a atração de polinizadores. Porém, considerando-se a característica de florescimento supra-anual típica dessa espécie, pode-se sugerir que ela realize autofecundação. Estudos posteriores são necessários para avaliar a possibilidade da espécie em realizar

autofecundação, o que poderia comprometer o potencial evolutivo, caso ela seja uma alógama.



Figura 2: Flores e frutos em indivíduos adultos de *C. echinata*. A) Detalhes das flores. B) Detalhes dos frutos tipo legume.

2.1.2. Importância sócio-econômica

Relatos históricos das primeiras expedições às terras brasileiras descrevem que o pau-brasil distribuía-se amplamente pela costa tropical atlântica, e que densas populações eram facilmente localizadas. Após a chegada dos portugueses, por volta de 500 anos atrás, a espécie foi explorada desordenadamente, ocasionando uma drástica redução das populações naturais existentes para atender à indústria tintorial. O ciclo econômico concentrou-se exclusivamente na Mata Atlântica, o habitat original do pau-brasil, desencadeando o isolamento das árvores remanescentes e resultando em uma pequena escala de multiplicação natural (BUENO, 2002).

O tronco foi alvo de intensa devastação, pois era extremamente cobiçado pelas indústrias civil e naval. Além disso, a popularização do pau-brasil na Europa, a partir do século XVI, deveu-se, principalmente, às variadas cores obtidas de seus pigmentos. O cerne era constituído do pigmento brasilina (pigmento encontrado em maior quantidade no tronco "fresco") e também de brasileína (pigmento oriundo da oxidação da brasilina), o qual era reduzido a pó pelas indústrias da França e Itália

visando à obtenção de um pigmento vermelho usado para dar cor aos tecidos da nobreza (AGUIAR; PINHO, 1996; OLIVEIRA et al., 2002). Adicionalmente, a excelente qualidade sonora da madeira do pau-brasil também contribuiu para ocasionar seu risco de extinção. A madeira era e ainda é empregada na fabricação de arcos de violino e outros instrumentos (RAMALHO, 1978; AGUIAR; BARBOSA, 1985; SOARES, 1985; LIMA, 2002). Atualmente, com o declínio do comércio do pau-brasil a partir de meados do século XIX, por causa da síntese de corante artificial, sua exploração se restringiu a demanda para exportação visando apenas à fabricação de instrumentos musicais (LIMA, 2002).

O pau-brasil desempenhou importante papel no mundo da moda, das finanças e da indústria têxtil europeia até meados do século XVIII. A princípio, utilizava *C. sappan*, nativo do sul da Índia e Ásia, o qual era fonte de cor vermelha. Mas com a descoberta do pau-de-tinta (outro nome como também é conhecido o pau-brasil), e a possibilidade de grandes negociações, os portugueses quando colonizaram o Brasil, tornaram a espécie o primeiro produto de exportação da nova colônia portuguesa, iniciando o primeiro ciclo econômico do Brasil. Além disso, o pau-brasil foi também o primeiro monopólio estatal, pois de 1502 a 1859 somente os portugueses exploravam a madeira (BUENO, 2002).

Mais recentemente, uma nova aplicação foi relatada por Cruz-Silva et al. (2004), mostrando uma importante aplicação biomédica do pau-brasil. As sementes de *C. echinata* possuem uma enzima, a proteinase serina, que está envolvida em diferentes processos biológicos como coagulação sanguínea e fibrinogênese.

2.2. Marcadores genético-moleculares

Marcadores genéticos são características qualitativas com herança mendeliana simples, facilmente reconhecidas e cuja expressão não é influenciada pelo ambiente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os primeiros marcadores eram morfológicos, em geral, apresentavam fenótipos de fácil visualização que eram comparados entre si. Eles foram utilizados em diversas análises genéticas, pois eram controlados por genes associados a caracteres fenotípicos. No entanto, como os marcadores morfológicos eram frequentemente controlados por genes dominantes, as variações fenotípicas eram raras, e as populações eram

classificadas como geneticamente homogêneas (FUTUYMA, 1992). Além disso, o número de marcadores morfológicos que se obtinha era baixo, o que limitava a sua aplicação e impossibilitava a estimativa de diversos parâmetros genéticos (AVISE, 2004). Eles foram amplamente aplicados até 1966, quando se iniciou a revolução no quadro dos marcadores (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Com a introdução de novos marcadores do tipo molecular, geneticistas, ecólogos e evolucionistas passaram a aplicar este recurso para responder diferentes questões biológicas. Além da disponibilidade do método comparativo utilizado anteriormente, agora os estudos podem incluir comparações diretas ou indiretas sobre informações genotípicas de ácidos nucleicos ou seqüências protéicas (AVISE, 2004).

As informações em nível molecular foram inicialmente obtidas com marcadores genéticos bioquímicos que, por definição, são produtos da expressão de genes (ROBINSON, 1998). As isoenzimas descritas por Lewontin e Hubby (1966), foram os primeiros marcadores a serem empregados, baseado na eletroforese de proteínas para avaliar a diversidade genética entre populações de *Drosophila*. Esta técnica ampliou o número de marcadores que poderiam ser utilizados e, desde então, foi amplamente aplicada em estudos de genética de populações.

Com o advento das técnicas de biologia molecular a partir de 1970, diversos métodos de detecção de polimorfismo em nível de DNA foram criados (marcadores genéticos moleculares), ampliando o número de ferramentas disponíveis para análises genéticas (O'HANLON et al., 2000).

Em 1968, foram descobertas as enzimas de restrição (LINN; ARBER, 1968; MESELSON; YUAN, 1968), que foram utilizadas por Grodzicker (1974) para analisar o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA, uma técnica que ficou conhecida como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Essa nova técnica apresentava vantagens significativas em relação aos marcadores anteriores, pois eram seletivamente neutros, possuíam distribuição aleatória no genoma e grande número de dados eram encontrados no genoma (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). Este marcador foi amplamente utilizado em genética aplicada ao melhoramento de plantas e ao estudo de genética de populações.

Na década de 1980 surgiram os marcadores minissatélites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), que são regiões dispersas no genoma constituídas de um número variável de seqüências idênticas repetidas lado a lado (em *tandem*).

Estas seqüências repetitivas possuem de 15 a 100 pares de bases e, em cada loco hiperváriavel, são repetidas até 50 vezes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Com os avanços da biologia molecular, surgiu a técnica da reação em cadeia polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), permitindo a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA. A partir dessa descoberta, outros marcadores moleculares foram descritos. Assim, surgiram as técnicas de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – WELSH; MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990), de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - ZABEAU, 1993) e de microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) (LITT; LUTY, 1989).

Além dos marcadores citados anteriormente, existem outras classes que apresentam pequenas modificações em relação a estes. Entretanto, estes quatro tipos (RFLP, VNTR, RAPD, AFLP e SSR) têm sido os mais empregados em estudos de genoma de plantas e animais (KARP et al., 1996; O'HANLON et al., 2000; SOUZA, 2001).

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em análises de parâmetros populacionais e reprodutivos. Eles possibilitam detectar a variação genética, estimar o fluxo gênico, analisar o sistema reprodutivo, dentre outros fins (OUBORG et al., 1999; O'HANLON et al., 2000, AVISE, 2004). Sendo genéticos, possuem um mecanismo de herança mendeliana e a propriedade de se comportarem como dominantes (RAPD e AFLP) ou codominantes (RFLP e SSR). Estes últimos apresentam a vantagem de distinção entre os genótipos heterozigotos e homozigotos. Essa possibilidade de estimar a freqüência alélica constitui a informação necessária para estimativa de diversos parâmetros genéticos populacionais (OUBORG et al., 1999).

Neste contexto, todos fornecem uma imensa gama de vantagens na resolução das mais complexas questões biológicas (KARP et al., 1996; OUBORG et al., 1999; O'HANLON et al., 2000). A escolha do marcador ideal é a chave para responder tais questões. A opção pelo ideal depende fundamentalmente da questão elaborada, mas, além disso, depende dos métodos de elaboração da parte técnica. O custo efetivo e a demanda de pessoal tecnicamente habilitado também exercem influência quanto à escolha de qual marcador utilizar (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; OUBORG et al., 1999).

Sendo assim, dentre os marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites, têm sido uma das ferramentas moleculares mais utilizadas nos últimos anos para estudos populacionais. Eles são os mais eficientes para gerarem dados que permitam auxiliar na formulação de estratégias de conservação (OUBORG et al., 1999).

2.2.1. Marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites, também denominados de seqüências simples repetidas (SSRs), vêm se constituindo numa poderosa classe de marcadores moleculares com uma ampla gama de aplicações no campo da genética, principalmente em estudos genéticos e ecológicos (OUBORG et al., 1999; O'HANLON, 2000).

Os SSRs são marcadores codominantes, capazes de detectar altos níveis de polimorfismo (GUPTA et al., 1996; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; OUBORG et al., 1999; LI et al., 2002). Eles consistem de pequenas unidades repetidas de nucleotídeos em *tandem*, que varia 1 a 6 nucleotídeos. Di, tri, e tetranucleotídeos são as repetições mais comuns, distribuídos por todos os genomas de plantas e animais (LI et al., 2002; O'HANLON, 2000). Segundo LI et al. (2002), essas seqüências repetidas distribuem-se de forma ampla no genoma, nas regiões codificadoras e não codificadoras, e são geralmente muito polimórficas por causa do alto nível de variação no número de repetições (ATHERLY et al., 1999).

Como outras classes de DNA repetitivo, os SSRs possuem altas taxas de mutação, numa faixa entre 10^{-3} e 10^{-4} por loco por gameta por geração, portanto, uma taxa de mutação superior em relação a outras regiões do genoma (AVISE, 2004), o que garante sua hipervariabilidade, ou seja, as mudanças no número de SSR repetidos. Esta instabilidade deve-se aos mecanismos, de deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação (TACHIDA; IIZUKA, 1992; TAUTZ; SCHLOTTERER, 1994), e de *crossing over* desigual, causado pelo pareamento errôneo das fitas de DNA durante o quiasma (HARDING et al., 1992), sendo os responsáveis pela maior taxa de mutação em regiões microssatélites (BROWN et al. 1996; LI et al., 2002).

Estes marcadores foram inicialmente estudados no genoma humano onde estão presentes em grande número de cópias, dispersos por todo o genoma

(HAMADA et al., 1982). No entanto, o primeiro trabalho em que estas seqüências repetidas foram denominadas microssatélites foi publicado em 1989 (LITT; LUTY, 1989). Em plantas, a presença das repetições (AC) e (AG) foi descrita pela primeira vez, inesperadamente, em espécies arbóreas tropicais (CONDIT; HUBBELL, 1991). Em um trabalho de revisão, Powell et al. (1996) descreveram que a abundância de microssatélites em animais e em humanos é muito superior à detectada em plantas. É possível encontrar pelo menos 20 pb de seqüências repetidas a cada 6 kb em mamíferos, enquanto que em plantas são encontradas em média a cada 33 kb. O tipo de dinucleotídeo repetido mais freqüente em vegetais é o AT seguido pelo AG e pelo AC (POWELL et al., 1996); entretanto, os microssatélites desenvolvidos para motivos AT são raros devido à autocomplementaridade das sondas utilizadas durante o desenvolvimento dos marcadores com este tipo de dinucleotídeos repetidos (RAFALSKI et al., 1996). Repetições de trinucleotídeos e tetranucleotídeos também foram encontradas nos genomas de plantas, sendo os motivos mais freqüentes (AAT), (AAC), (AGC), (AAG), (AATT) e (AAAT) (WANG et al., 1994; AKKAYA et al., 1995; GUPTA et al., 1996).

O número de repetições em tandem de um microssatélite geralmente varia. A seqüência de bases adjacentes ao microssatélite pode ser única no genoma e conservada (no mesmo loco) entre diferentes indivíduos da mesma espécie. Assim, pode-se desenhar um oligonucleotídeo específico para as regiões adjacentes a um dado loco microssatélite, de forma que, por meio de uma reação de PCR será possível amplificar este loco em diferentes genótipos. Como o número de unidades repetidas em tandem em um microssatélite pode ser variável entre diferentes genótipos, os produtos de amplificação dos diferentes indivíduos mostrarão um polimorfismo no tamanho do fragmento amplificado (SOUZA, 2001).

Entre os marcadores moleculares disponíveis, os SSRs são considerados os ideais para análises de genética populacional (CHASE et al. 1996b; OUBORG et al., 1999). Dentre as características que os torna viáveis para este fim, destacam-se a abundância e distribuição uniforme em muitos genomas, hipervariabilidade e o aspecto codominante. Essas características conferem elevado conteúdo informativo a esses marcadores. Além disso, a facilidade de obtenção por meio de PCR (requerendo pouco DNA para amplificação) é outra vantagem desse marcador (RAFALSKI et al., 1996; CHASE et al. 1996b; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; O'HANLON et al., 2000).

A grande limitação deve-se ao custo inicial para o desenvolvimento dos *primers*, pois cada loco é definido por um par de *primers*. Porém, este custo é facilmente compensado pelo grande número de aplicações em diversas análises ao se possuir tal ferramenta para uma determinada espécie (GRATTAPAGLIA, 2001). Além disso, a possibilidade de transferibilidade entre espécies geneticamente relacionadas do mesmo gênero aumenta o número de dados que podem ser obtidos a partir desse marcador (RAFALSKI et al., 1996, CHASE et al., 1996b; DAYANANDAN et al., 1997).

Estes marcadores foram utilizados na diferenciação e estrutura genética em plantas (WHITE et al., 1999; COLLEVATTI et al., 2001, PRIOLLI et al., 2002; COART et al., 2003; ZUCCHI et al., 2003), na determinação de origem parental por teste de paternidade (DOW; ASHLEY, 1996; CIAMPI, 1999; GAIOTTO et al., 2003), em estudos de conservação (ZAWKO et al., 2001; LIRA et al., 2003), dinâmica populacional (SCHNABEL; HAMRICK, 1995; DAYANANDAN et al., 1999; AL-RABAB'AH; WILLIAMS; 2002; LIAN et al., 2003; WANG et al., 2004) e na construção de mapas de ligação (AKKAYA et al., 1995; BRONDANI et al., 1998; CREGAN et al., 1999).

Em espécies arbóreas tropicais, os SSRs têm sido aplicados com sucesso em estudos de fluxo gênico, diversidade e estrutura genética de populações tais como: *Caryocar brasiliense* (COLLEVATTI et al., 2001), *Euterpe edulis* (GAIOTTO et al., 2003) e *Caesalpinia echinata* (LIRA et al., 2003), sendo este último SSR de cloroplasto. Nos estudos de conservação genética de populações naturais, o emprego de poderosas ferramentas como os microssatélites tiveram uma grande contribuição na melhoria das estimativas de parâmetros genéticos, especialmente em populações com diversidade genética baixa ou até mesmo não detectada por outros métodos. Um aspecto geral dos estudos genéticos é que pouca informação pode ser obtida sobre a estrutura de populações caso os marcadores empregados não sejam suficientemente polimórficos. Neste aspecto, estimativas de parâmetros genéticos populacionais críticos, tais como a diferenciação genética e endogamia para algumas espécies e medidas diretas de fluxo gênico e tamanho efetivo populacional para muitas espécies, foram grandemente beneficiadas com o advento dos marcadores moleculares altamente polimórficos (CHASE et al., 1996b, OUBORG et al., 1999; LI et al., 2002).

2.3. Conservação da biodiversidade

A biologia da conservação é uma ciência multidisciplinar desenvolvida em resposta à crise que afeta a diversidade biológica (SOULÉ, 1985). Ela baseia-se em dois objetivos principais que são: entender os efeitos da atividade humana nas espécies, comunidades e ecossistemas; e desenvolver abordagens práticas para prevenir a extinção de espécies e, se possível, reintegrar as espécies ameaçadas ao seu ecossistema funcional (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Nesse contexto, torna-se necessário complementar as disciplinas aplicadas, fornecendo uma abordagem mais teórica e geral para a proteção da diversidade biológica. Dessa forma, os esforços para conservação biológica devem agregar conhecimento sobre a estrutura do hábitat e modelos genéticos das espécies para garantir a manutenção da diversidade genética (SCHMITT; SEITZ, 2002; FRANKHAM, 2003).

Em cada nível de diversidade biológica (espécie, comunidade e ecossistema), os biólogos da conservação pretendem estudar os mecanismos que alteram e, ou, mantêm essa variação em todos os campos, principalmente os mecanismos que influenciam a variabilidade genética das espécies e afetam sua distribuição (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A diversidade genética de uma espécie é frequentemente influenciada por efeitos da deriva genética, endogamia, fluxo gênico e pelo comportamento reprodutivo dos indivíduos dentro das populações (ELLSTRAND; ELLAM, 1993). Os indivíduos, normalmente, são geneticamente diferentes entre si, e essa variação deve-se à presença de diferentes genes gerados pelas mutações que acabam formando alelos distintos. São esses alelos distintos de cada gene polimórfico que permitem quantificar a variabilidade genética entre os indivíduos (HARTL, 2000; AVISE, 2004). Esta variabilidade possibilita que as espécies se adaptem a um meio ambiente dinâmico. Em uma espécie de tamanho populacional reduzido, há menos variação genética do que em espécies com populações maiores o que, conseqüentemente, as tornam mais vulneráveis à extinção quando as condições do meio ambiente se alteram (FRANKHAM, 1999; SCHMITT; SEITZ, 2002).

Neste contexto, observa-se que as estratégias de conservação, manejo e recuperação das espécies ameaçadas requerem uma abordagem que envolva informações sobre a ecologia populacional e a estrutura genética da espécie (GANDARA; KAGEYAMA, 1998; SCHMITT; SEITZ, 2002). A maioria dos modelos

de conservação biológica que envolve estudos de genética inclui análises de depressão endogâmica, perda do potencial evolucionário, estrutura genética populacional, diversidade e adaptação genética em cativeiro (GANDARA; KAGEYAMA, 1998; FRANKHAM, 1999; GAIOTTO et al., 2003). Dessa importante interdependência entre ecologia e genética, surgiu uma nova disciplina dentro do enorme campo da biologia da conservação, conhecida como genética da conservação (MEFFE; CARROL, 1997). A genética da conservação é uma ciência aplicada cuja idéia fundamental, segundo O'Brien (1994), é descrever a composição genômica de pequenas populações ameaçadas de extinção. Segundo Frankham (1999), são essas pequenas populações que tendem à endogamia e perda da variabilidade genética e, conseqüentemente, ao aumento do risco de extinção. A importância dos fatores genéticos na análise de populações selvagens é altamente reconhecida por contribuir significativamente para entender a biologia da espécie e minimizar o risco de extinção (FRANKHAM, 2003). Sendo assim, antes de submeter uma espécie às estratégias de conservação, é indispensável entender tanto a sua biologia quanto a sua dinâmica populacional.

No caso do pau-brasil, algumas iniciativas conservacionistas já estão implementadas, no entanto, há uma grande carência de informações ecológicas e genéticas sobre a espécie. Alguns estudos com a espécie já foram realizados por Cardoso et al. (1998), Lira et al. (2003), Melo et al. (2004) e Zaia (2004). Entretanto, para permitir que a espécie se desenvolva naturalmente e otimizar sua conservação, todas as informações devem ser consideradas para evitar a perda dos alelos raros de maneira que as estratégias elaboradas sejam baseadas tanto em dados ecológicos da espécie, como também subsidiadas por dados genéticos, de modo a oferecer condições apropriadas para a preservação das populações de pau-brasil.

Vale ressaltar que os dados genéticos não contribuem apenas para a conservação da diversidade genética de uma única espécie, e sim para conservação de outras espécies e comunidades ecológicas (FRANKHAM, 1999), visto que todas estão interagindo continuamente dentro dos ecossistemas. A perda de uma espécie, uma população ou até uma comunidade biológica inteira abala o equilíbrio ecológico do ecossistema como um todo (WILSON, 1997).

2.3.3. Estratégias de conservação *ex situ*

A conservação *ex situ* é a manutenção de estabelecimentos artificiais com amostras de organismos fora de seu habitat natural na forma de indivíduos inteiros, sementes, pólen, propágulos vegetativos e culturas de células ou tecidos (BOTANIC GARDENS CONSERVATION INTERNATIONAL, 2001). Estabelecimentos como jardins botânicos, arboretos e banco de sementes são estratégias adotadas para evitar a extinção de espécies com pouca representatividade numérica, e ficam sob a supervisão humana (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; LI et al., 2002b). Nos últimos anos, os jardins botânicos têm tido um importante papel na conservação de espécies raras e ameaçadas de extinção. Além disso, ainda possuem herbários associados de exsicatas (plantas secas) representando uma das melhores fontes de informação sobre distribuição e exigências de habitat (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Este método de conservação apresenta vantagens como, por exemplo, o fácil acesso do público, permitindo uma maior conscientização ambiental. Entretanto apresenta uma desvantagem significativa que inviabiliza sua aplicação: a limitação das espécies em função da disponibilidade de espaço.

Além da produção de plantas nos jardins botânicos, as coleções de sementes estocadas em temperatura fria de ambiente seco são de grande valia para os esforços conservacionistas. Um banco de sementes possui a capacidade de estocar grande quantidade de sementes de muitas espécies ocupando pouco espaço, com pouca supervisão e a baixo custo. No entanto, corre o risco de uma coleção inteira ser perdida, caso ocorra algum problema no local de armazenamento. Entretanto, mesmo em estocagem a frio, as sementes gradativamente perdem a capacidade de germinação por causa da exaustão de seus nutrientes, sendo necessário germinar periodicamente para estocar novas sementes (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Cabe ressaltar que durante o período de formação e maturação das sementes, a água assume papel crucial e seu teor permanece elevado até o final do desenvolvimento. Ao final, elas podem se comportar como ortodoxas ou recalcitrantes. As primeiras são capazes de tolerar a dessecação, o que ocorre com o pau-brasil, que tolera até de 7,6% de água facilitando o armazenamento e ampliando o potencial de conservação da espécie para fins de reposição das populações naturais (BARBEDO et al., 2002). As recalcitrantes, por outro lado,

apresentam limites de tolerância à dessecação e são independentes dessa secagem para adquirir a capacidade germinativa.

2.3.2. Estratégias de conservação *in situ*

A conservação *in situ* é definida como a preservação de comunidades naturais e populações no ambiente selvagem, tendo seu potencial evolutivo assegurado. É forma complementar à estratégia *ex situ* de conservação da biodiversidade (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; ROCHA, 2004), realizada especialmente para florestas tropicais, onde os níveis de diversidade são ainda pouco conhecidos (GANDARA, 1997).

A proteção do habitat é considerada um dos métodos mais eficientes de preservar a diversidade biológica. No entanto, as áreas disponíveis para proteção estão cada vez mais restritas por causa das crescentes necessidades humanas. A escassez de habitat natural reduz a capacidade de as espécies manterem a estrutura e a dinâmica populacional, sendo necessário criar novas áreas protegidas para evitar a extinção de várias espécies (SEAL, 1997).

O estabelecimento de áreas de proteção deve ser eficientemente planejado para manutenção da diversidade biológica (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). A área da reserva deve ter um tamanho suficiente para permitir que as interações dentro das comunidades permaneçam ocorrendo. Além disso, os efeitos de borda e de fragmentação devem ser minimizados de modo a evitar a diminuição do número de indivíduos da população que favorece a perda da variação genética (ELLSTRAND; ELLAM, 1993; GANDARA; KAGEYAMA, 1998; PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

Embora alguns autores tenham enfatizado a importância da conservação *in situ*, os esforços nesta área eram realizados, na maioria dos casos, baseados em dados empíricos e conhecimento geral da diversidade de comunidades e ecossistemas (GANDARA, 1997). Atualmente, os esforços para conservação biológica estão agregando conhecimento sobre a estrutura do hábitat e modelos genéticos das espécies para garantir a manutenção da diversidade genética no seu local de origem (SCHMITT; SEITZ, 2002). As estratégias desenvolvidas possuem base no conhecimento dos padrões de dispersão de pólen e sementes e da capacidade de regeneração de determinada espécie. Existe ainda uma grande

preocupação em relacionar os estudos demográficos aos genéticos, para que a conservação de populações naturais seja realizada de maneira eficiente, a fim de preservar a maior percentagem possível de indivíduos que representem geneticamente a espécie em questão (CIAMPI, 1999; SCARIOT, 1999).

Neste sentido, estão sendo empregadas ferramentas moleculares para caracterizar e quantificar geneticamente as espécies passíveis de extinção. No entanto, apesar da disponibilidade de verificar a diversidade biológica por meio de análises genéticas, a biodiversidade está seriamente comprometida pelas constantes atividades humanas que degradam o meio ambiente (GANDARA et al., 1997; FRANKHAM, 1999).

2.3.3. Ameaças à diversidade genética

Para preservar espécies com sucesso, os biólogos da conservação devem identificar as atividades humanas que afetam a estabilidade das populações e levam as espécies à extinção. As principais atividades humanas desenvolvidas em áreas florestais têm degradado e alterado drasticamente o meio ambiente, resultando na destruição dos habitats. A perda do habitat é um dos fatores que mais influenciam na queda da biodiversidade (YOUNG et al. 1996; GANDARA et al., 1997, FRANKHAM, 1999; TABARELLI et al., 1999; PRIMACK; RODRIGUES, 2001). A intensa devastação está mudando a estrutura genética das populações e reduzindo a diversidade genética das espécies. Quando o habitat é destruído, fragmentos florestais são criados. A fragmentação florestal é um processo de formação de mosaicos de habitats, que incluem fragmentos de diferentes tamanhos. Além de isolar reprodutivamente indivíduos que contém apenas uma pequena amostra do conjunto gênico da população original (gargalo genético), pode causar contínua perda de alelos devido a deriva genética, caso a população permaneça isolada por várias gerações. Além disso, aumenta drasticamente o efeito de borda e a endogamia, enquanto que o fluxo gênico fica restrito, aumentando as chances de extinção das espécies (YOUNG et al., 1996).

Em curto prazo, a perda da variabilidade genética pode reduzir a aptidão individual da espécie, inviabilizando o remanescente populacional. A longo prazo, a redução da riqueza alélica deve limitar a habilidade das espécies a responderem às

mudanças ocasionadas pelas forças seletivas (ELLSTRAND; ELLAM, 1993; LENOMARD, 2002).

Desta forma, vale ressaltar que a grande riqueza de espécies que se encontra nas florestas tropicais está seriamente comprometida. As florestas tropicais estão incluídas entre os ecossistemas mais ricos em espécies do planeta que, pela alta taxa de desmatamento e degradação de seus ambientes, têm sofrido a perda de inúmeras espécies da fauna e flora, pela redução da área de ocorrência e isolamento dos habitats originais (YOUNG et al., 1996; WILSON, 1997).

O Brasil, apesar de possuir a maior riqueza biológica do mundo, teve sua mata original reduzida a pequenas extensões. Em estado crítico se encontra a Mata Atlântica, considerada uma das grandes prioridades para a conservação de biodiversidade em todo o continente americano. Sua cobertura florestal encontra-se reduzida a cerca de 6% da área original (THOMAS, 2001).

Além disso, a superexploração também contribui para o declínio da biodiversidade. A exploração de recursos naturais pelo homem aumentou assustadoramente devido ao crescimento exponencial da população nas últimas décadas. No Brasil, este processo iniciou-se com a colonização, e tem sido muito acelerado neste século. Por causa disso, o uso do ambiente se intensificou, levando ao declínio e à extinção de muitas espécies (GANDARA et al., 1997; FRANKHAM, 1999; PRIMACK; RODRIGUES, 2001), como é o caso do pau-brasil (CARDOSO et al., 1998) e de várias outras espécies vegetais e animais. A superexploração e conseqüente modificação dos habitats tornaram-se uma das principais causas de extinção de espécies e perda de biodiversidade (DEAN, 1996).

2.4. Conseqüências do isolamento populacional

Com a formação dos fragmentos florestais, as espécies tornam-se isoladas e suscetíveis a algumas conseqüências desastrosas (YOUNG et al., 1996; GANDARA; KAGEYAMA, 1998). Os efeitos genéticos deste isolamento dependem do tamanho dos isolados formados. Assim, se uma população for dividida em isolados grandes, o resultado do isolamento será uma redução da freqüência dos homozigotos na população de referência (efeito de Wahlund). Em isolados pequenos, o isolamento pode acentuar esse efeito, porque em decorrência da variação aleatória das freqüências gênicas ao longo das gerações tanto pode haver a eliminação quanto a

fixação de um ou mais genes, independente do valor adaptativo que eles conferem (ELLSTRAND; ELLAM, 1993; BEIGUELMAN, 1995).

Dessa forma, uma medida relevante utilizada na conservação genética é o tamanho efetivo populacional (N_e) ou a representatividade genética das populações. O tamanho efetivo de uma população é dependente dos níveis de endogamia, deriva genética e parentesco existentes nas amostras, sendo que quanto maiores estes níveis, menor é a representatividade genética da amostra (VENCOVSKY, 1987; VENCOVSKY; CROSSA, 2003).

O conhecimento do N_e é uma informação importante ao estudo da estrutura genética das populações. As eventuais reduções no tamanho populacional têm efeito sobre as gerações futuras (ELLSTRAND; ELLAM, 1993; ROBINSON, 1998). Uma drástica redução no tamanho efetivo populacional, ocasionada pela exploração florestal, por exemplo, tem sido denominada de efeito de gargalo genético (YOUNG et al., 1996). Isto porque após sua ocorrência é muito difícil recuperar o tamanho efetivo original, a não ser que a redução do N_e não seja muito acentuada (VENCOVSKY, 1987). No entanto, se esta população de N_e reduzido colonizar uma nova área (efeito fundador), todos os genes da população assim originada terão derivado daqueles portados pelos fundadores e de mutações e imigrantes ocasionais (FUTUYMA, 1992). Todavia, essa nova população retém uma diversidade genética semelhante à população de origem, após o gargalo. Entretanto, segundo Falconer (1989), se ela permanecer isolada, as mudanças nas frequências alélicas podem resultar em aumento na diferenciação entre as subpopulações e na redução da variabilidade genética se as populações forem pequenas.

A manutenção de um tamanho efetivo populacional adequado diminui a probabilidade dessas oscilações genéticas e da endogamia. Quanto maior o tamanho efetivo, menor será a magnitude da deriva genética. Isto significa que, mantendo-se um tamanho efetivo adequado ao longo das gerações, maior é a probabilidade das frequências alélicas permanecerem próximas da população de origem (TEMPLETON et al., 1990; ELLSTRAND; ELLAM, 1993).

Da mesma forma, quanto maior o tamanho efetivo, menor será o nível de cruzamento entre indivíduos aparentados que ocorre por autofecundação ou por fecundação biparental (endogamia) (HARTL, 2000). Caso ocorra uma drástica redução do número de indivíduos, conseqüentemente ocorrerá um aumento do grau de parentesco dentro de uma área de vizinhança que pode, com o passar das

gerações, resultarem em cruzamentos entre indivíduos aparentados e, conseqüentemente, no aparecimento de endogamia. O índice de fixação (F_{IS}) de uma população aumenta à medida que o tamanho das populações diminui. A principal conseqüência desse efeito é o aumento dos indivíduos homozigotos dentro das populações (FUTUYMA, 1992). Pequenas populações tendem a perder os heterozigotos por deriva genética mais freqüentemente do que populações mais numerosas (ELLSTRAND; ELAM, 1993), aumentando a ocorrência de alelos recessivos deletérios em homozigose, que se mantinham escondidos quando em heterozigotos (FALCONER; MACKAY, 1996).

A deriva genética apresenta numerosas conseqüências evolutivas dentre elas a perda de variação genética dentro das populações e a divergência genética entre elas (FUTUYMA, 1992). Nos pequenos fragmentos, a mudança aleatória na freqüência alélica dos indivíduos, resulta em uma pequena amostra dos alelos da geração parental (ELLSTRAND; ELAM, 1993; FUTUYMA, 1992), resultando em aspectos problemáticos para variabilidade genética. A perda de variabilidade genética dentro de uma população implica na redução da performance reprodutiva da espécie causando alterações na fertilidade, viabilidade das sementes, vigor, e adaptação (NEI, 1975; ELLSTRAND; ELAM, 1993; SEOANE et al., 2000).

Portanto, nos pequenos isolados ocorre uma queda da variabilidade genética, onde a endogamia e a deriva são as principais causas (ELLSTRAND; ELLAM, 1993; GANDARA; KAGEYAMA, 1998). Juntos, estes fatores resultam em uma depressão na composição genética da espécie (FRANKHAM, 2003), aumentando o risco de extinção de populações selvagens.

Assim, tanto por endogamia, deriva ou seleção poderá ocorrer formação de grupos divergentes entre as populações. No entanto, esta diferença pode ser contrabalanceada pelo fluxo gênico, conforme discutido por Wright (1951), sendo que espécies com intenso fluxo de pólen e sementes têm menor diferenciação do que espécies com movimentação restrita (CIAMPI, 1999; SEOANE et al., 2000). Alguns relatos demonstraram que somente uma pequena quantidade de fluxo gênico a longas distância é suficiente para retardar a diferenciação da subpopulação para alelos neutros (LOVELESS; HAMRICK, 1984; ELLSTRAND; ELAM, 1993; SORK et al., 1999; CIAMPI, 1999). O fluxo gênico é o fator responsável pela homogeneização das populações, restringindo os efeitos da deriva genética e seleção (FUTUYMA, 1992).

Neste aspecto, a grande idéia da biologia da conservação é preservar a diversidade genética em todos níveis da hierarquia filogenética, além de promover a continuidade de processos ecológicos e evolucionários que fortaleçam e sustentam a biodiversidade. Deriva genética, fluxo gênico, seleção e endogamia são exemplos de processos evolucionários dinâmicos e naturais, os quais podem ser quantificados por meio de marcadores moleculares. A importância desses marcadores se deve à propriedade que eles possuem em facilitar o entendimento da natureza da vida, mais especificamente, por permitirem a conservação em diferentes níveis, pois possibilitam a avaliação da filogenia, da variação genética entre os indivíduos, do parentesco, de estrutura populacional, dentre outros (AVISE, 2004).

2.5. Variabilidade e estrutura genética de populações

O estudo de genética de populações é atualmente muito empregado por causa da possibilidade de se estudar as populações com base no DNA, a partir de marcadores moleculares (HARTL, 2000). Anteriormente, os indivíduos de uma população eram distinguidos fenotipicamente, por características influenciadas pelo ambiente as quais não ofereciam dados suficientes para análises genéticas. Atualmente, as análises são independentes de diferenças visíveis e sem a necessidade de fazer cruzamentos controlados. Elas são baseadas em diferenças genotípicas, onde os diferentes genótipos oferecem múltiplos alelos de muitos locos permitindo abranger todo o genoma e de qualquer espécie, fornecendo inúmeros dados genéticos, sem sofrer influência ambiental (HARTL, 2000; AVISE, 2004). Nesse contexto, a genética de populações baseia-se no estudo da ocorrência natural de diferenças genéticas entre os organismos (HARTL, 2000), detectadas por meio de técnicas de biologia molecular (AVISE, 2004).

O estudo da variação genética em populações naturais de uma espécie envolve basicamente duas questões: (i) quantificar os níveis de variabilidade dentro das populações e (ii) caracterizar o modo de distribuição dessa variabilidade, ou seja, o nível de estruturação genética entre populações. Segundo Hamrick (1983), é de extrema importância conhecer a variabilidade genética tanto dentro como entre as populações para permitir elaborar estratégias de conservação, manejo e melhoramento dos recursos genéticos. Há a necessidade de se entender como a

variação encontra-se distribuída e quais as características do ambiente e da espécie influenciam essa distribuição para ampliar a base de conhecimento antes de delinear estratégias de conservação (GANDARA et al., 1997).

A diversidade genética tem sido referida como o nível de variabilidade gênica existente dentro de cada população (NEI, 1973; FUTUYMA, 1992) que pode ser medida pelo nível de heterozigosidade esperada nas proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg independente do sistema reprodutivo. Weir (1996) considera que a heterozigosidade esperada, ou diversidade gênica, é uma medida adequada para quantificar a variação tanto em população de espécies autógamas, como em alógamas. Além disso, Weir (1996) também concorda que a frequência de heterozigotos é um importante indicador da diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega dois alelos diferentes.

A distribuição da diversidade genética reflete a ação de um conjunto de processos evolutivos que promovem mudanças nas frequências gênicas e genotípicas estruturando as populações (FUTUYMA, 1992). Além da mutação, que é a principal força de criação de variação genética em uma espécie, a recombinação e a migração também atuam na ampliação dessa diversidade. No entanto, o modo como esta variação está distribuída entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie depende de outros fatores tais como: o sistema de reprodução, os padrões de dispersão de pólen e sementes, habitat de distribuição, seleção microambiental e deriva (BROWN, 1978; HAMRICK, 1983). A distribuição da variabilidade genética ainda pode ser influenciada pela ação antrópica e pelo aumento considerável da destruição de habitats. Essa destruição implica na redução da variabilidade genética que sob efeitos de deriva e ausência de fluxo gênico pode ocasionar o isolamento populacional e conseqüentemente a divergência entre as populações (YOUNG et al., 1996). Dentre estes fatores, a migração e a mutação aumentam a variabilidade genética, enquanto que a seleção e a deriva diminuem a variabilidade dentro das populações. Ao mesmo tempo, estes dois fatores aumentam a diferenciação entre as populações, enquanto que a movimentação de pelo menos um migrante por geração ($Nm > 1$) é capaz de contrapor os efeitos da deriva (WRIGHT, 1951).

Desta forma, espera-se que espécies com grandes populações, fecundação cruzada, mecanismos eficientes de dispersão de sementes e pólen, apresentem alta variação genética dentro das populações e baixa entre. Por outro lado, espécies com

tamanho populacional reduzido, que realizem autofecundação e, ou, reprodução vegetativa, com limitada dispersão de pólen e sementes, deverão apresentar baixa variabilidade dentro e alta entre as populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984, HAMRICK; LOVELESS, 1986).

A existência de uma estruturação espacial decorre principalmente das limitações físicas, o que não permite o cruzamento de todos com todos, havendo maior probabilidade de cruzamentos entre indivíduos próximos que levam a redução de heterozigotos e formação de demes panmíticas, estruturando geneticamente a população (FUTUYMA, 1992). Esses cruzamentos preferenciais levarão a uma tendência localizada de fixação de alelos, pois apenas uma amostra da população estará trocando alelos ao acaso. Além disso, a deriva genética, a seleção e o fluxo gênico estarão contribuindo de forma diferenciada de modo a ampliar ou reduzir a divergência existente entre as populações (NEI, 1975; GANDARA; KAGEYAMA, 1998, SEOANE et al. 2000; LENOMARD, 2002).

Estudos diversos sobre a estrutura genética de populações de espécies arbóreas tropicais fragmentadas apresentam maiores níveis de variabilidade genética dentro do que entre as populações (SEBBEN et al., 1999; SEOANE et al., 2000; LEMES et al., 2003). Isto está de acordo com o modelo de isolamento por distância de Wright (1943), segundo o qual, quanto maior é a distância entre as populações ou subpopulações, mais restrito é a dispersão de pólen e sementes, levando ao isolamento das unidades amostrais e ao aumento da divergência genética por deriva ou seleção.

2.6. A dinâmica do fluxo gênico

A dinâmica populacional de plantas pode ser significativamente afetada por fatores evolutivos tais como seleção e deriva genética, e conseqüentemente sofrer impactos na estrutura populacional. Entretanto, a grandeza dos efeitos desses fatores na variação genética dependerá da capacidade reprodutiva de cada organismo e das taxas de fluxo gênico (GAIOTTO et al., 2003).

O fluxo gênico age de maneira contrária aos efeitos da deriva, mantendo a diversidade genética. Um migrante por geração é o suficiente para evitar os efeitos da deriva (WRIGHT, 1951; ELLSTRAND; ELAM, 1993). Como conseqüência, este efeito tende a homogeneizar a composição genética da população, mas é essencial

para conservação, pois evita a depressão por endogamia e a deterioração da variação genética nas pequenas populações. No entanto, reduzindo a variação genética reduz também o valor adaptativo, podendo dificultar a adaptação da espécie ao meio e levar essas populações a um possível risco de extinção (LENORMAND, 2002).

Por definição, fluxo gênico é o movimento de genes em populações e, portanto inclui todos os movimentos de gametas, propágulos e indivíduos que efetivamente trocam genes na distribuição espacial (NEIGEL, 1997). O fluxo gênico ou dispersão é um dos processos centrais na dinâmica e evolução das populações de plantas.

A dinâmica espacial é determinada pelo grande número de movimento de genes dentro e entre populações (ELLSTRAND; ELAM, 1993; OUBORG et al., 1999). No entanto, este fluxo pode ser perdido devido ao isolamento espacial e conseqüentemente, ao isolamento reprodutivo das espécies em ambientes fragmentados. Neste contexto, é viável considerarmos que a dinâmica se deve principalmente ao fluxo gênico, ou seja, ao processo migratório de alelos entre populações. O efeito da migração de alelos entre populações da mesma espécie depende da proporção de indivíduos migrantes e da diferença nas freqüências do alelo nas duas populações. A seleção natural poderá atuar a favor de elevar freqüências de alelos introduzidos, caso eles confirmem alguma vantagem adaptativa aos indivíduos portadores dos mesmos (BEIGUELMAN, 1995).

O fluxo gênico pode ser uma importante força evolutiva (SLATKIN, 1987). Quando os níveis de hibridização são elevados e a taxa de incorporação de alelos externos supera as taxas de mutação, o fluxo gênico torna-se a principal fonte de evolução da população (ELLSTRAND; DEVLIN, 1990), cujos efeitos são dependentes da ação do novo alelo na população. Alelos que não conferem vantagem competitiva no ambiente em que estas populações se encontram, portanto neutros, não devem causar um grande impacto “per se”, visto que não haverá pressão seletiva atuando no sentido de aumentar ou diminuir suas freqüências. Neste caso, as alterações na estrutura das populações dependem da deriva genética, sendo importante, principalmente, em pequenas populações (WRIGHT, 1969).

Atualmente, diferentes questões biológicas estão recorrendo a medidas de diferenciação genética desenvolvidas por Nei (1972), nas quais a quantificação da

dispersão é fundamental. No entanto, quantificar a dispersão requer estudos adicionais, baseados em métodos analíticos poderosos (BOSSART; PROWELL, 1998). Medidas indiretas baseadas apenas em estatísticas ecológicas são pouco eficientes. Para evitar questionamentos é necessário associar os métodos ecológicos às ferramentas genéticas disponíveis, as quais estão sendo amplamente empregadas para avaliar diferentes questões biológicas. Estas ferramentas, conhecidas como marcadores moleculares, disponibilizam uma enorme quantidade de dados, sendo que a escolha correta de qual utilizar é a parte chave do estudo. O desenvolvimento desses marcadores moleculares tem aumentado o número de estudos de dispersão, anteriormente avaliadas apenas com auxílio das isoenzimas (OUBORG et al., 1999). Os diferentes tipos de técnicas expressam quantidades diferentes de variabilidade genética, permitindo estimar a distribuição dos alelos no espaço. Essa distribuição é altamente influenciada pelo fluxo gênico via pólen ou sementes, deriva genética, seleção natural, recombinação e mutação. Segundo Ouborg et al. (1999) e Gaiotto et al. (2003), existem dois métodos para avaliar a dispersão de genes dentro e entre populações, um indireto e outro direto. Pelo método indireto, o fluxo gênico é inferido via F_{ST} , alelos privados e coalescência, a partir da distribuição da variação genética entre as populações e se refere ao fluxo gênico do passado, enquanto que pelo método direto, a estimativa de fluxo gênico é realizada por testes de paternidade com auxílio de marcadores moleculares altamente informativos e se refere ao fluxo gênico contemporâneo. Segundo ELLSTRAND e DEVLIN (1990), este método é mais vantajoso para estimar a troca efetiva de gametas entre as populações.

3. METODOLOGIA

3.1. Caracterização da área de coleta do material vegetal de *C. echinata*

A área de coleta compreendeu duas populações de *Caesalpinia echinata* em fragmentos da Mata Atlântica localizadas no Sul da Bahia, que se encontram distantes entre si aproximadamente 165 km (Figura 3). Uma delas, a Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra do Teimoso (S. do Teimoso), localiza-se em Jussari, BA. Esta reserva compreende uma área de 200 ha de floresta semi-decídua, sendo que à medida que a altitude aumenta, o ambiente torna-se mais úmido, encontrando espécies de mata higrófila (THOMAS, 2001). Nesta área foram coletadas folhas de 44 adultos para análise da estrutura genética e 144 regenerantes de diferentes idades para o estudo de parentesco. Os regenerantes foram amostrados próximos à suposta árvore-mãe, em um raio de até 15 metros.

A outra reserva biológica encontra-se na Estação Ecológica Pau-Brasil-ESPAB, de 1.145 ha, contínua com a Estação Veracruz de cerca de 6.069 ha, em Porto Seguro, BA, na qual foram coletadas folhas de 54 indivíduos adultos para análise de estrutura genética e estudo de diversidade comparada com a outra população. Esta reserva destaca-se pelos solos de tabuleiros, com vegetação da floresta perenifólia latifoliada higrófila hileana baiana. A estação apresenta uma enorme diversidade de espécies, sendo que o pau-brasil foi encontrado em grande número e bem distribuído dentro da reserva.

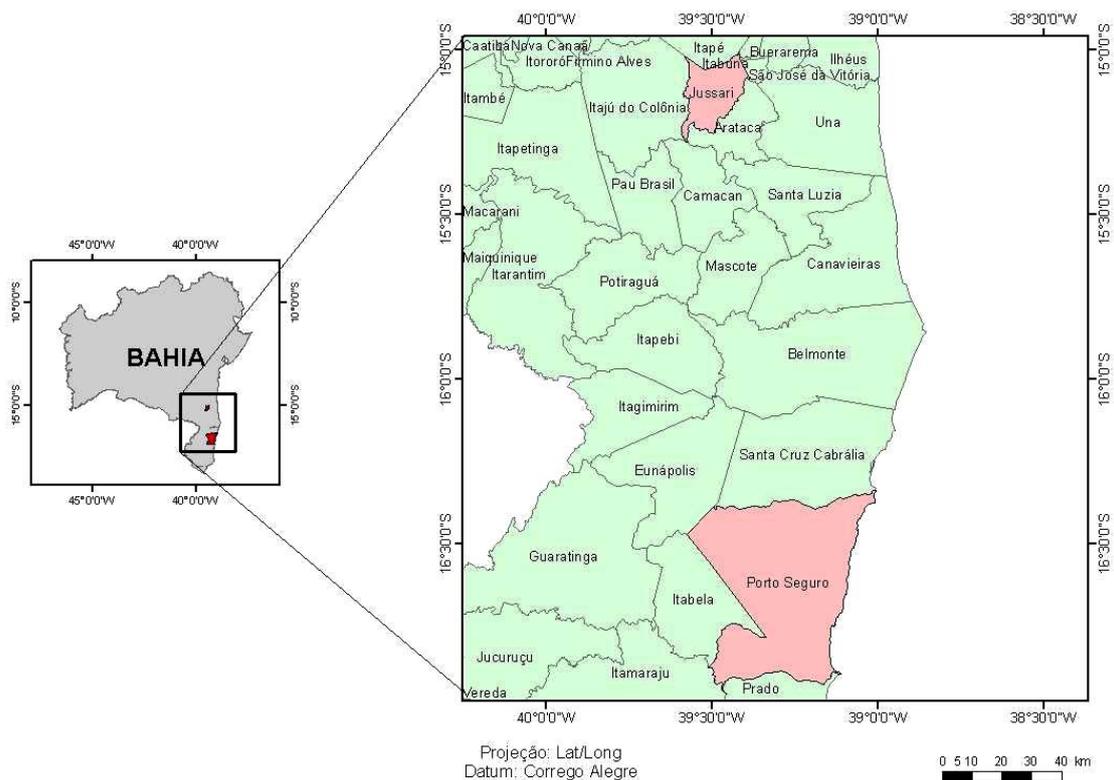


Figura 3: Locais de coleta de pau-brasil: RPPN Serra do Teimoso (Jussari) e Reserva Ecológica ESPAB (Porto Seguro).

3.2. Extração de DNA genômico de *C. echinata*

O DNA foi extraído pelo método CTAB como descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). A folha foi macerada em tubos Eppendorfs de 2 mL, na presença de nitrogênio líquido. Após a maceração foram adicionados 750 µL de tampão de extração CTAB 2%, agitando-se no vortex e deixados em banho-maria por 30 a 40 minutos, sendo invertido a cada 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v) e, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa contendo o DNA foi transferida para outro tubo e o DNA foi precipitado por adição de 400 µL isopropanol, seguido de incubação por 30 minutos a -20°C. Logo após, foi centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa foi retirada e o precipitado foi lavado duas vezes com álcool 70% e uma vez com 95%. O pellet ficou em temperatura ambiente por 90 minutos e depois foi ressuspensão em 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹ / EDTA, pH

8,0 a 1 mmol.L⁻¹) com RNase (livre de DNase) 10 µg/mL e incubado por 30 minutos a 37 °C para degradar os RNAs presentes.

3.3. Padronização e amplificação com os *primers* microssatélites

Os *primers* microssatélites de pau-brasil foram desenvolvidos por Rosana Brondani Collevatti (dados não publicados) e posteriormente padronizados pela equipe de marcadores moleculares da UESC. A padronização da temperatura de anelamento dos *primers* foi realizada em reação de PCR com gradiente de temperatura. Após a definição da temperatura ideal de cada *primer*, eles foram sintetizados e marcados com fluorocromos específicos (6-FAM = azul, TED = verde e HEX = amarelo).

A mistura de reação foi composta por 30 ng de DNA genômico, 1,3 µL de dNTP a 2,5 µmol.L⁻¹, 0,39 µL de MgCl₂ a 50 mmol.L⁻¹, 1,3 µL de tampão PCR 10X (Tris-HCl 1 mol.L⁻¹, KCl 50 mol.L⁻¹, pH 8,3), 1,3 µL de BSA a 2,5 mg/ml, 0,26µL de cada par *primer* a 10 µmol.L⁻¹ (sendo um deles marcado com fluorescência) e 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5u/µL) (Invitrogen) e 5,25 µL de água autoclavada. As amplificações foram realizadas utilizando-se termociclador programado para o seguinte protocolo: 96 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento por um minuto, 72 °C por 1 minuto, terminando com 7 minutos a 72 °C.

Após a amplificação, eles foram analisados em gel desnaturante de alta resolução (4% poliacrilamida) no seqüenciador automático de DNA (ABI 377/ Applied Biosystems, CA). As reações de PCR foram diluídas nas proporções de 1:5, 1:8 e 1:10 a fim de otimizar a análise dos tamanhos dos alelos de cada loco, uma vez que o sistema de leitura do seqüenciador automático é muito sensível, mesmo às pequenas quantidades de fluorescência utilizadas nas reações (MITCHELL et al. 1997). Para cada 2 µL de reação diluída, foram adicionados 2 µl de tampão de carregamento de formamida e 1 µL do marcador molecular ROX-500. Esta mistura foi desnaturada a 95 °C por 3 minutos. A eletroforese foi realizada, em média, por 2 h.

Para otimização dos ensaios multiplex, foram realizadas eletroforeses combinadas de acordo com as cores de fluorescência e a amplitude alélica dos locos,

de modo a maximizar a quantidade de locos analisados simultaneamente em um único gel de eletroforese.

A detecção e estimativa do tamanho dos alelos foram realizadas de maneira semi-automática, tendo-se como referência o padrão de DNA de tamanho conhecido (Rox-500/ABI), com o auxílio dos programas GeneScan (ABI) e Genotyper (ABI).

Após a padronização das condições de reação para cada par de *primer*, eles foram empregados para amplificar amostras de 242 indivíduos, como descrito anteriormente. Para cada loco foi determinado o número médio de alelos e a amplitude alélica presente nas duas populações estudadas.

3.5. Análises genético-estatísticas

A quantificação da diversidade genética e a análise de sua distribuição entre as duas populações, foram realizadas a partir de dados de marcadores genéticos codominantes do tipo microssatélite. As estatísticas F de Wright (Wright, 1965; Nei, 1977) foram estimadas sob modelo aleatório de Weir (1996). Este modelo é aplicado quando o interesse está voltado ao quanto as populações se diferenciaram dentro de uma espécie, no decorrer do tempo, uma vez que essas populações possuem uma origem comum e sofreram processo de diferenciação ao acaso. As ações de forças evolutivas ou da amostragem genética resultarão na diferenciação intra-específica e interespecífica, quantificada através das frequências alélicas, do número de alelos por loco (A), da heterozigosidade observada (H_o), da diversidade gênica (H_e) e das estatísticas F de Wright (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}), sendo estimados por meio do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2005). Para avaliar a significância dos valores obtidos foram realizados *bootstraps*, utilizando 10.000 reamostragem sobre todos os locos, no intervalo de confiança de 95% de probabilidade.

Por outro lado, por causa do excepcional mecanismo de mutação nos locos microssatélites, os parâmetros baseados no modelo de *alelos infinitos* (IAM) não são aplicados para este marcador (GOLDSTEIN et al. 1995). Por isso, para microssatélites, o processo de mutação *stepwise*, o qual inclui a repetição alélica, é o mais consistente. Em função disso, além da estatística F_{ST} , é empregada uma análoga desenvolvida por Slatkin (1995), conhecida com R_{ST} a qual considera o processo mutacional do tipo *stepwise*. Este parâmetro, juntamente com o fluxo

gênico aparente (Nm) foram estimados com o auxílio do programa R_{ST} Calc (GOODMAN, 1997).

As frequências genóticas de cada loco foram submetidas ao teste exato de Fisher para verificar a aderência às proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg conforme definido por Weir (1996), com auxílio do programa TFPGA (MILLER, 1997). Este teste foi feito por meio do método convencional de Monte Carlo, utilizando 10 *batches* com 10.000 permutações por *batch*.

O tamanho efetivo populacional (N_e) foi estimado para cada população de acordo com Vencovsky e Crossa (2003):

$$N_e = \frac{n}{(1 + f)}$$

em que:

n é o tamanho amostral;

f é o índice de endogamia (F_{IS}).

O fluxo gênico pode ser quantificado através de medidas diretas e indiretas. O método indireto foi realizado via F_{ST} e baseia-se na análise da estrutura genética de populações para estimar o número de migrantes por geração (Nm). Este fluxo, chamado de aparente, refere-se ao passado das populações. Ele admite como modelo de fluxo gênico o tipo “ilhas infinitas” (WRIGHT, 1951), o qual assume equilíbrio entre migração e deriva genética entre todas as populações, havendo igual troca de genes entre elas.

O método direto foi estimado a partir da utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélite para análise de parentesco. Este método baseia-se na utilização de locos genéticos obtidos com microssatélites para determinar os mais prováveis pais de um conjunto de genitores candidatos (TRAVER, 1998). Os testes de parentesco foram realizados através do método de exclusão. A análise de exclusão de maternidade-paternidade foi realizada através da comparação dos genótipos de todos os indivíduos adultos (44 adultos, S. Teimoso e 54 da ESPAB), contra cada um dos regenerantes amostrados na S. Teimoso (144). Para cada regenerante foram excluídos os adultos que não poderiam ser seus parentais, e

identificados todos aqueles que puderam ser excluídos desta possibilidade. A exclusão foi baseada na estimativa do índice de maternidade-paternidade para cada loco (IMP), indicando qual a probabilidade do suposto parental ser o verdadeiro parental do regenerante em comparação com os outros adultos. O índice de maternidade-paternidade combinada (IMPC) obtida entre os locos em equilíbrio de ligação, foi utilizada para inferir a probabilidade de maternidade-paternidade (PMP), que corresponde à probabilidade do suposto parental ser o parental biológico. A PMP foi investigada com a probabilidade “a priori” de 0,01, que indica a probabilidade do suposto parental ser o parental biológico entre os 98 indivíduos adultos. Esse modelo de estimação foi descrito por TRAVER (1998):

$$PMP = \frac{(IMPC)P}{(IMPC)P + (1 - P)}$$

em que

P é a probabilidade “a priori” de o genitor ser o verdadeiro parental, baseado em dados não-genéticos.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das populações

A S. Teimoso apresenta na base da montanha, um ambiente com duas estações bem definidas, onde foram encontrados indivíduos desta espécie em meio à área antropizada sofrendo influências agropastoris. A maioria dos acessos adultos foi amostrada ao longo da serra, sendo que na área basal este número era reduzido, fato que permite inferir que a ação extrativista ocorrida no passado era facilitada neste local devido ao fácil acesso. Na parte mediana, ocorrem afloramentos rochosos, e se localiza adjacente a cultura de cacau, onde foram encontrados indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento. Além disso, um número elevado de indivíduos jovens num trecho de área em regeneração que compreende o entorno da montanha, sugerindo-se que houve um favorecimento para germinação das sementes e o estabelecimento das plântulas. As coordenadas geográficas obtidas durante as coletas de amostras de folhas dos adultos foram utilizadas para gerar o mapa geográfico, permitindo determinar as distâncias entre as matrizes (Figura 4).

A Estação Ecológica do Pau-Brasil apresenta-se como uma área composta de inúmeras espécies vegetais com importância florestal distribuídas em uma área de 1.145 ha. O pau-brasil encontra-se bem distribuído nesta área e a grande maioria dos indivíduos são adultos evidenciando que esta população é um remanescente da época colonial.

Em ambas populações, alguns adultos apresentaram porte superior a exemplares relatados por Lima (2002), cujos portes variavam de 10 a 12 m de altura. O diâmetro a altura do peito (DAP) variou de 11 a 61 cm, estando de acordo com

Rizzini (1971), cujo DAP variava de 30 a 50 cm e algumas raras vezes atingindo 70 cm em exemplares nativos.

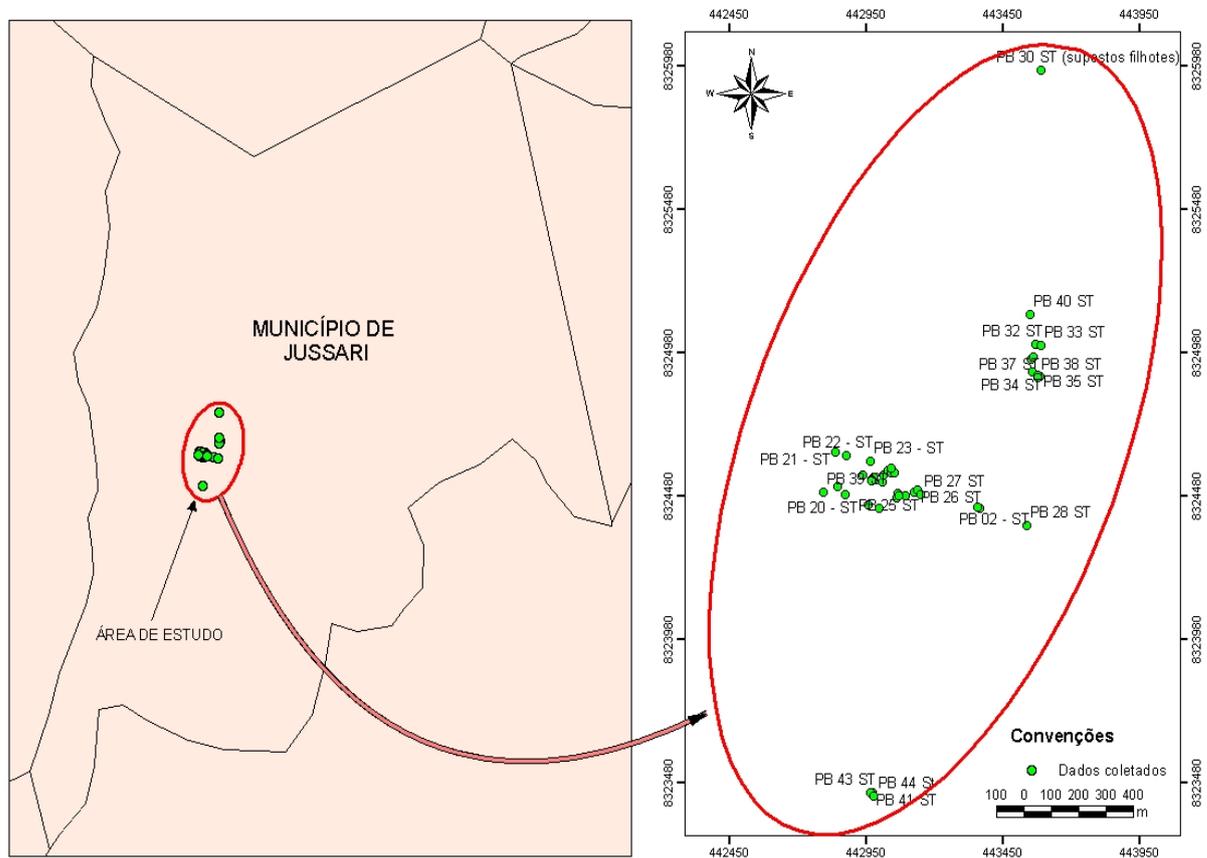


Figura 4: Mapa geográfico. Localização da RPPN S. Teimoso ($15^{\circ} 12' S$ e $39^{\circ} 29' W$) no município de Jussari, BA, e distribuição das árvores adultas coletadas.

4.2. Extração do DNA genômico

Todos os 242 indivíduos amostrados tiveram seu DNA extraído e apresentaram resultados satisfatórios. A análise da qualidade e a quantificação do DNA foram feitas por visualização direta em gel de agarose 1%. As três primeiras canaletas de cada gel continham amostras de DNA do fago lambda de concentração molecular conhecida, sendo $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$, respectivamente, que foram utilizadas para estimar a quantidade de DNA obtido de cada amostra (Figura 5).

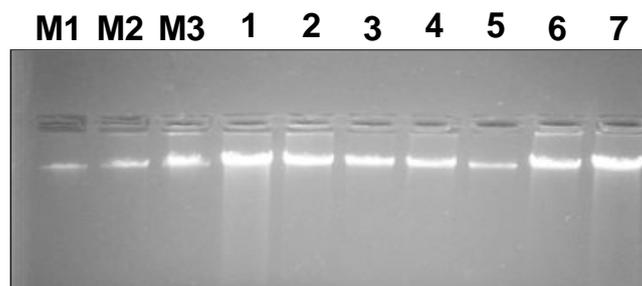


Figura 5: Análise de qualidade e estimativa de concentração de DNA. Amostras de DNA total de sete plantas de pau-brasil (1 a 7), separadas por eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídio e digitalizadas pelo sistema EDAS290/Kodak. As três primeiras canaletas contém DNA do fago lambda como marcador de concentração de DNA: M1 = 50 ng/μL; M2 = 100ng/μL; M3 = 200ng/ μL.

4.3. Caracterização dos locos microssatélites

Dos 26 *primers* desenhados por Rosana Brondani Collevatti, 10 apresentaram padrões de amplificação típicos de microssatélites (Figura 6). Todos os locos foram submetidos a uma variação de temperatura extensa para permitir a definição da temperatura ideal de anelamento de cada *primer*. A temperatura ideal foi considerada aquela que os *primers* apresentaram as bandas mais definidas e robustas com o menor número possível de amplificações inespecíficas (Tabela 1).

Após a definição da temperatura de anelamento de cada par de *primer* e da marcação dos *primers*, a amplitude alélica por loco foi estimada a partir da amplificação de 44 indivíduos adultos da população de *C. echinata* provenientes da S. Teimoso, com auxílio dos programas GeneScan e Genotyper (Tabela 1). Com base nessas estimativas, foi definida a composição dos grupos de pares de *primers* (multiplex) que foram empregados na etapa de análise automática dos produtos de aplicação dos demais indivíduos no seqüenciador. Este sistema permitiu empregar de três a cinco locos por ensaio no seqüenciador otimizando o tempo e diminuindo os custos da pesquisa. A Figura 7 ilustra um gel do tipo multiplex, os eletroferogramas de alguns locos após a eletroforese no seqüenciador automático e a análise de genotipagem dos indivíduos. A maior intensidade de fluorescência foi identificada com a marcação azul e verde em comparação com amarela.

Todos os dez locos analisados mostraram-se típicos microssatélites em função do alto nível de polimorfismo. Juntos produziram 116 alelos no total, com uma média de 11,6 alelos por cada loco nas duas populações de adultos analisadas (98 indivíduos). Todos os locos de *C. echinata* foram submetidos ao teste exato de Fischer que revelou desvios do EHW em todos os locos. A heterozigiosidade observada apresentou-se sempre inferior à esperada, provavelmente devido à presença de alelos nulos ou à seleção contra heterozigotos (Tabela 2). O loco CE 14 apresentou valores extremamente reduzidos de freqüências genotípicas observadas em relação aos valores esperados, possivelmente por causa da presença de alelos nulos.

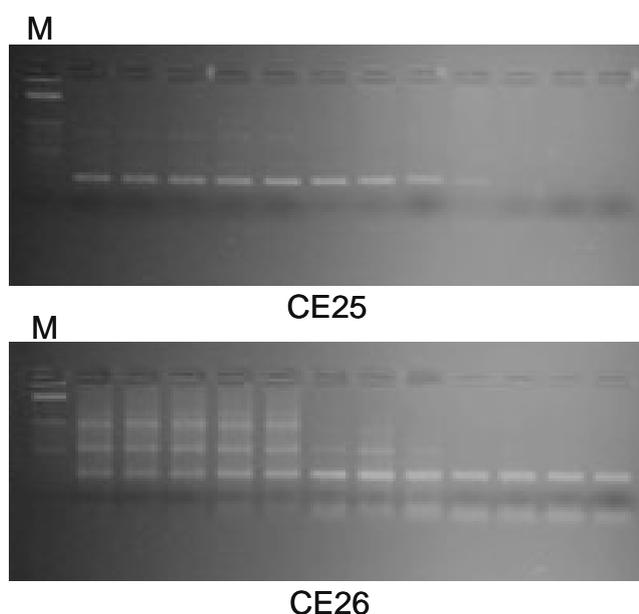


Figura 6: Padrão de ampliações de DNA em gradiente de temperatura. Produtos PCR separados por eletroforese em gel de agarose 3,5%, com dois primers microssatélites em 12 diferentes temperaturas de anelamento. Todos os locos foram amplificados a partir do mesmo DNA de um indivíduo de pau-brasil. M = DNA do fago lambda digerido com as enzimas de restrição *Bam* HI, *Eco* RI e *Hind* III, marcador de peso molecular.

Tabela 1. Relação de pares de *primers* e respectivas marcações, temperatura de anelamento e amplitude alélica

<i>Primer*</i>	Marcação**	Temperatura de anelamento	Amplitude alélica
CE 02	6-FAM	56 °C	250 - 290 pb
CE 07	TED	59 °C	90 – 144 pb
CE 09	HEX	59 °C	140 – 160 pb
CE 11	6-FAM	59 °C	100 -140 pb
CE 14	TED	59 °C	190 – 200 pb
CE 18	6-FAM	59 °C	178 – 200 pb
CE 19	TED	59 °C	220 – 250 pb
CE 23	HEX	63 °C	100 -140 pb
CE 25	6_FAM	59 °C	170 – 200 pb
CE 26	TED	63 °C	170 – 190 pb

*Seqüências: informação não publicada de Rosana Brondani Collevatti

**Fluorocromos utilizados na marcação: TED = fluorescência verde; 6-FAM = fluorescência azul; HEX = fluorescência amarela

Tabela 2: Locos microssatélites. Número de alelos por loco (*A*), estimativas da diversidade gênica (*H_e*) e heterozigosidade observada (*H_o*)

<i>LOCO</i>	<i>A</i>	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>
CE 02	18	0,879	0,627
CE 07	23	0,904	0,595
CE 09	10	0,822	0,577
CE 11	14	0,785	0,463
CE 14	5	0,573	0,010
CE 18	5	0,500	0,360
CE 19	9	0,751	0,172
CE 23	12	0,734	0,214
CE 25	12	0,821	0,371
CE 26	8	0,767	0,377
Média	11,6	0,754	0,376

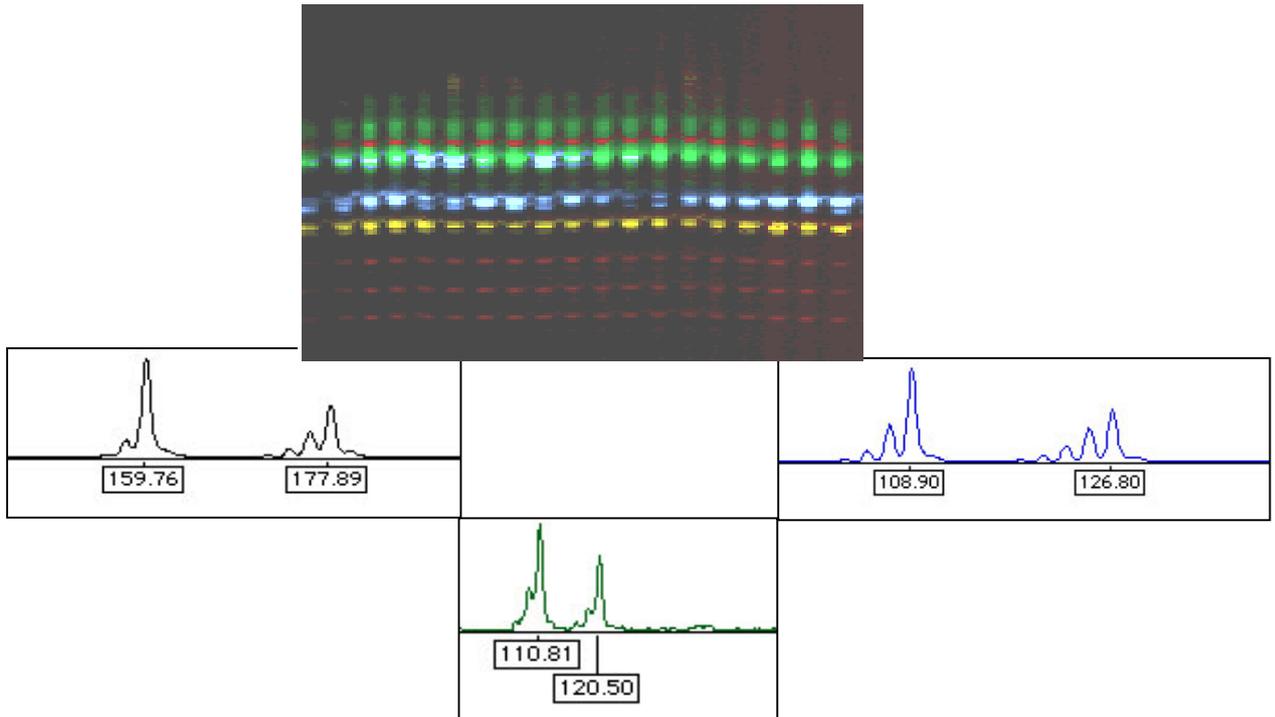


Figura 7: Ensaio multiplex (triplex). Produtos de amplificação com os *primers* CE14, CE18 E CE23, separados por eletroforese no seqüenciador ABI377, com os tamanhos dos alelos de cada loco determinados com auxílio dos programas GeneScan e Genotyper.

4.3. Estrutura genética

A variabilidade e estrutura genética intrapopulacional e interpopulacional foram avaliadas com base na amplificação de dez locos microssatélites. A diversidade alélica encontrada no grupo de indivíduos adultos da população de S. Teimoso foi moderadamente alta ($H_o = 0,53$), ao contrário do grupo de regenerantes ($H_o = 0,37$) que foi baixa, o que indica um excesso de homozigotos entre os indivíduos. O índice de fixação (F_{IS}) na população adulta foi inferior ao encontrado na população de regenerantes, o que pode estar relacionado à situação ecológica atual que estes grupos se encontram (Tabela 3). O coeficiente de coancestralidade ($F_{ST} = 0,15$) entre adultos e regenerantes dentro da população S. Teimoso foi

superior ao esperado em progênies de meio-irmãos (0,125). Este valor também indica quanto os estágios são diferentes geneticamente entre si.

Em relação às populações adultas examinadas, S. Teimoso e ESPAB, ambas apresentaram um número elevado de alelos por loco. A população de S. Teimoso apresentou, em média, 8 alelos, enquanto a população da ESPAB teve 6,9, em média, as duas populações naturais apresentaram 7,45 alelos (Tabela 4). As duas populações também apresentaram altos níveis de heterozigosidade esperada (H_e) (Tabela 4). A heterozigosidade observada (H_o) foi de 0,53 (S. Teimoso) e 0,24 (ESPAB) (Tabela 4), caracterizando um excesso de homozigotos, principalmente na população da ESPAB. O coeficiente de endogamia estimado para população da ESPAB foi excepcionalmente alto e significativo ($F_{IS} = 0.59$), e fora dos padrões esperados para populações naturais de espécies arbóreas tropicais alógamas. Este índice ressalta a tendência ao excesso de homozigotos dessa população (Tabela 4).

Os locos mais polimórficos na população S. Teimoso foi o CE 02 e o CE 07 com 10 alelos cada, enquanto o loco CE 14 apresentou-se com poucos alelos. Por outro lado, a população da ESPAB apresentou maior número de alelos no loco CE 07 e CE 11, e menor número no CE 14.

O índice médio de fixação (F_{IS}), ou a probabilidade de dois alelos em um indivíduo amostrado aleatoriamente dentro das duas populações naturais adultas serem idênticos por descendência, foi de 0,387 (0,276 a 0,524), indicando forte ocorrência de endogamia (Tabela 4). O coeficiente de coancestralidade estimado via R_{ST} e F_{ST} foi de 0,26 de 0,31, respectivamente. Ambas foram significativamente diferentes de zero (Tabela 5), com intervalo de confiança de 95%, e apresentaram-se acima do esperado entre progênies de irmãos completos (0,25) sugerindo que os indivíduos das populações estão proximamente relacionados entre si. Este índice também indica que as populações encontram-se em um forte processo de diferenciação.

O índice de fixação total ($F = 0,579$) foi alto e significativo (0,458 a 0,711), evidenciando forte desvio da pressuposição de panmixia.

A estimativa do fluxo gênico, ou do número de migrantes entre as populações por geração, foi baixo ($Nm < 1$). O parâmetro Nm foi estimado a partir do R_{ST} indicando um baixo fluxo de migrantes entre as duas populações, corroborando com o resultado de diferenciação genética entre elas (Tabela 5).

O tamanho efetivo populacional (N_e) foi calculado com base no índice de endogamia (F_{IS}) de cada população, e mostrou-se representativo para ambas. A população de S. Teimoso apresenta um N_e de 38 indivíduos, enquanto a população da ESPAB apresentou 33,9, aproximadamente 34 indivíduos (Tabela 4). A partir dessa estimativa e considerando a necessidade de conservar um $N_e = 500$ (HEDRICK; MILLER, 1992), foi estimado com base no índice de estruturação populacional R_{ST} , que o número de populações a serem conservadas é de 262, baseado nas duas populações analisadas.

Tabela 3: Descrição genética da população de indivíduos adultos e regenerantes de *C. echinata* de S. Teimoso, com base em dez locos microssatélites.

População	N	A	H_e	H_o	F_{IS}^*
Adultos	44	8	0,63	0,53	0,15
Regenerantes	140,9	11	0,74	0,37	0,49
Média	92,45	9,5	0,68	0,45	0,34

* significativamente diferente de zero através de 10.000 *bootstraps* e 95% de intervalo de confiança

N: número de indivíduos amostrados

A: número médio de alelos

H_e : diversidade gênica

H_o : heterozigosidade observada

F_{IS} : coeficiente de endogamia dentro da população

Tabela 4: Genética descritiva entre as duas populações naturais de *C. echinata*

População	N	A	H_e	H_o	F_{IS}^*	N_e
S. Teimoso	44	8	0,63	0,53	0,15	38,26
ESPAB	54	6,9	0,59	0,24	0,59	33,9
Média	47,75	7,45	0,61	0,38	0,37	-

*significativamente diferente de zero através de 10.000 *bootstraps* e 95% de intervalo de confiança.

N: número de indivíduos amostrados;

A: número médio de alelos;

H_e : diversidade gênica;

H_o : heterozigosidade observada;

F_{IS} : coeficiente de endogamia dentro da população;

N_e : tamanho efetivo populacional.

Tabela 5: Estatísticas F de Wright, R_{ST} e o número de migrantes por geração (Nm) para as duas populações naturais de *C. echinata*, considerando um intervalo de confiança de 95% de probabilidade

	F_{IS}^*	F_{IT}^*	F_{ST}^*	R_{ST}^*	Nm^*
Sob todos os locos	0,387	0,579	0,313	0,262	0,701
IC 95% (superior)	0,524	0,711	0,413	0,324	0,858
IC 95% (inferior)	0,276	0,458	0,220	0,225	0,520

*significativamente diferente de zero através de 10.000 *bootstraps* e 95% de intervalo de confiança.

F_{IS} : coeficiente de endogamia dentro da população;

F_{IT} : endogamia total

F_{ST} : coeficiente de coancestralidade

R_{ST} : análogo ao F_{ST}

4.4. Análise de parentesco

Dos 144 regenerantes coletados na S. Teimoso, apenas 15 deles (10,41%) tiveram a determinação de pelo menos um possível genitor, de acordo com a análise de exclusão de maternidade-paternidade, considerando a probabilidade “a priori” de 0,01. Esta probabilidade foi estimada a partir do número dos possíveis genitores (1/98). Para os quinze regenerantes, foram estimados os índices e probabilidades de maternidade-paternidade. As probabilidades foram consideradas significativas quando superiores a 80%. Esta estimativa foi obtida a partir do índice de maternidade-paternidade combinada (IM-PC), que se refere a evidência genética para cada genitor, baseado em todos os índices de maternidade-paternidade obtidos. Para os indivíduos onde uma ou mais exclusões foram detectadas, e a probabilidade de maternidade-paternidade foi superior a 80%, foram considerados ter um provável genitor na população. Isso porque o loco SSR apresenta alta taxa de mutação, tornando possível haver uma falsa exclusão por causa de diferenças de poucas bases. Para os demais regenerantes, a exclusão de maternidade-paternidade foi confirmada quando dois ou mais locos evidenciavam a exclusão, ou ainda, apresentaram uma probabilidade de maternidade-paternidade inferior a 80%, considerando um mínimo de sete locos analisados.

Observa-se também um sucesso reprodutivo diferenciado do genitor 2 em comparação a todos os outros adultos, visto que ele contribui com maior número de plântulas. Provavelmente, ele apresenta algum fator genético ou localização ecológica favorável.

Esta análise demonstrou a precisão necessária obtida a partir de dados microssatélites para investigar a relação de parentesco. Estes marcadores são altamente informativos e permitem a obtenção de um grande número de dados. No entanto, para este tipo de análise, quanto maior número de locos empregados, maior é a confiabilidade dos resultados.

Tabela 6: Análise de parentesco. Relação das plântulas analisadas e os supostos genitores, com número de locos analisados e as probabilidades de maternidade-paternidade.

<i>Plântulas</i>	<i>Suposto Genitor</i>	<i>N. L.</i>	<i>PM/P (P = 0,5)</i>	<i>PM/P (P = 0,01)</i>
ST 52	22	7	0,998	0,841
ST 73	38	7	0,999	0,965
ST 97	4	7	0,999	0,975
ST 104	2	8	0,997	0,811
ST 105	8	9	0,999	0,968
ST 106	2	8	0,999	0,932
ST 108	32	10	0,999	0,992
ST 110	13	8	0,999	0,952
ST 113	4	8	0,999	0,962
ST 124	44	8	0,999	0,963
ST 125	8	9	0,999	0,995
ST 125	9	9	0,999	0,995
ST 130	20	8	0,999	0,981
ST 139	23	7	0,999	0,991
ST 142	2	7	0,998	0,854
ST 144	23	8	0,999	0,968

N.L.: número de locos analisados;
 PM/P: probabilidade de maternidade-paternidade
 P: probabilidade a priori

5. DISCUSSÃO

5.1. Os locos microssatélites

A principal consequência da devastação florestal é perda da diversidade genética. A fragmentação do habitat reduz o tamanho das populações e aumenta o isolamento entre os remanescentes (YOUNG et al., 1996). Por isso, é de grande importância quantificar os efeitos da fragmentação no nível e na distribuição da diversidade genética dentro e entre os remanescentes florestais para elaborar estratégias de conservação de espécies em ambientes fragmentados (BAWA, 1994). Sendo assim, ferramentas moleculares têm sido utilizadas para avaliar o risco de erosão genética de diferentes espécies, dentre elas, os marcadores microssatélites são os mais eficientes para gerar dados detalhados de uma espécie. Este é o primeiro trabalho com *C. echinata* por meio de microssatélites genômicos visando obter informações para elaboração de estratégias eficientes de conservação.

Os dez locos microssatélites desenvolvidos para *C. echinata* apresentaram 11,6 alelos por loco nas duas populações naturais, demonstrando alto nível de polimorfismo detectado por este marcador. Da mesma forma, Gaiotto et al. (2001) desenvolveram 18 locos microssatélites de *Euterpe edulis*, encontrando uma média de 10,6 alelos por loco e Brondani et al. (2003) desenvolveram oito locos SSR para indivíduos de *Ceiba petandra*, encontrando uma média de 14 alelos por loco. Estes marcadores freqüentemente apresentam elevado nível de polimorfismo, o que os tornam superiores a outros marcadores moleculares. Em função disso, os microssatélites são os marcadores recomendáveis para análise de genética de populações, tendo sido empregados em diversos trabalhos (ROSSETO et al., 1999; DAYANANDAN et al., 1999; COART et al., 2003; GAIOTTO et al., 2003). Os *primers* desenvolvidos para *C. echinata* poderão ser testados em outras espécies

proximamente relacionadas, para verificar a transferibilidade. Dados preliminares permitiram verificar que alguns desses 10 *primers* permitem amplificar DNA de *Caesalpinia ferrea*. Em geral, os SSR são caracterizados para cada espécie. No entanto, alguns locos de SSR estão conservados em espécies relacionadas (DAYANANDAN et al., 1997).

Para verificar a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), os locos de *C. echinata* foram submetidos ao teste exato de Fischer que revelou desvios do EHW em todos os locos. O modelo de Hardy-Weinberg possibilita testar se as frequências genóticas encontram-se nas proporções esperadas para populações de cruzamentos aleatórios e que não estejam sofrendo efeitos de deriva, seleção, mutação e migração. O desvio pode ser causado por fatores evolucionários e pelo sistema misto de reprodução. Assim como o pau-brasil, *C. petandra* (Brondani et al., 2003) também apresentou desvio do EHW em todos os locos. Por outro lado, Gaiotto et al. (2001) demonstraram que apenas cinco dos dezoito locos analisados não aderiram ao EHW, possivelmente por causa da amostragem ou pela presença de alelos nulos. Sendo assim, o pau-brasil pode ter apresentado uma heterozigosidade observada inferior devido a fatores como a presença de alelos nulos, a uma forte seleção contra heterozigotos ou ainda por uma provável ocorrência de cruzamento entre indivíduos aparentados, o qual também foi sugerido para *C. petandra*.

A maioria dos locos apresentou-se robusta na interpretação dos alelos e com baixo nível de *stutter* (múltiplos fragmentos com tamanhos aproximados ao do fragmento típico de determinado alelo microssatélite), o que é positivo uma vez que a ocorrência fragmentos *stutter* na amplificação de regiões microssatélites pela DNA polimerase pode comprometer a determinação do tamanho do alelo, mesmo quando esta é feita em seqüenciador automático (HABERL; TAUTZ, 1999). Essa característica foi marcante no *primer* CE 25, sendo necessário cuidados adicionais ao analisá-lo.

Com o desenvolvimento dos marcadores microssatélites, uma poderosa ferramenta molecular, torna-se possível obter informações sobre modelo de variabilidade genética, fluxo gênico e sistema de cruzamento em populações naturais o que possibilita a elaboração de estratégias eficientes de conservação e manejo dessa espécie (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; OUBORG et al., 1999).

5.2. Estrutura genética

Trabalhos para caracterizar a variabilidade genética em populações naturais de espécies arbóreas têm sido realizados em uma grande variedade de espécies. Muitas espécies têm sido encontradas manter maior variabilidade dentro do que entre populações, indicando que há um número efetivo de migrantes dentro das espécies arbóreas (HAMRICK; LOVELESS, 1986, 1989; SCHIERENBECK et al., 1997; GAIOTTO et al., 2003). Entretanto, em populações de diferentes áreas geográficas, a diferenciação genética entre elas pode ser maior, principalmente aquelas que estão separadas há um longo período (CHASE et al., 1995; GILLIES et al., 1997). A distribuição e a quantidade de variação genética são influenciadas por fatores como o sistema de cruzamento, a distribuição geográfica, a longevidade e a fecundidade (HAMRICK; GODT, 1990).

White et al. (1999) analisando populações fragmentadas de *S. humilis* encontrou um alto nível de diversidade alélica ($H_e = 0,548$) por meio de dez locos SSR. Segundo eles a diversidade alta se deve ao passado da população, a qual existia como floresta contínua. A maioria da diversidade genética foi encontrada dentro dos fragmentos, com altos níveis de fluxo gênico aparente ($Nm = 8,9$) que minimizou a diferenciação genética ($R_{ST} = 0,032$) entre eles, retratando o passado da população. Zawko et al. (2001) analisando uma espécie ameaçada de extinção, *Leucopogon obtectus*, por meio de marcadores AFLP e RAPD, detectaram, assim como White et al. (1999), uma alta diversidade dentro das populações e pouca diferença genética entre elas. Estes resultados estão de acordo ao comportamento de outras espécies arbóreas (DAYANANDAN et al., 1999; GAIOTTO et al. 2003), analisadas com microssatélites. Por outro lado, espécies analisadas de diferentes regiões geográficas como *Swietenia macrophylla*, estudada por Lemes et al. (2003), apresentam alto nível de polimorfismo intrapopulacional. Mas, em função do isolamento por distância, a diferenciação genética entre elas tornou-se significativa ($R_{ST} = 0,147$).

No caso do pau-brasil, Cardoso et al. (1998) avaliaram a diversidade genética em populações provenientes do Rio de Janeiro, do Espírito Santo e da Bahia, por meio de marcadores RAPD, e encontrou apenas 42% de variação dentro das populações. Este resultado é considerado baixo para espécies que realizam fecundação cruzada. Além disso, a diferenciação entre elas foi significativamente

alta (0,28). A diversidade de pau-brasil proveniente de diferentes regiões geográficas (BA, RJ e ES) também foi estudada por Lira et al. (2003), com base em SSR cloroplastídicos, confirmando a baixa diversidade dos indivíduos e a alta diferenciação entre as populações de pau-brasil analisadas (0,36). No presente estudo, um alto nível de diversidade foi encontrado para as duas populações fragmentadas de *C. echinata*, ao contrário dos trabalhos citados anteriormente. Os dez locos microssatélites utilizados na análise permitiram detectar elevado índice de diversidade alélica, caracterizando a ampla variação genética da espécie. No entanto, a heterozigosidade observada (H_o) foi significativamente menor nas duas populações. A população da ESPAB apresentou uma H_o muito baixa, enquanto a população de S. Teimoso foi um pouco superior, mesmo assim revelando um excesso de homozigotos. O aumento de homozigotos indica a possível existência de um processo endogâmico, decorrente de desvios de panmixia, em razão da fragmentação da população original, ou do efeito fundador. Este resultado permite sugerir que pode estar havendo uma constante presença de alelos nulos e que principalmente, esteja ocorrendo cruzamento preferencial entre os indivíduos aparentados.

Considerando a população de S. do Teimoso, era esperado que a diversidade (H_e) fosse alta, pois é uma população natural, e que o H_o fosse menor devido a situação ecológica na qual a população se encontra. Esta população é um fragmento florestal que se localiza em uma reserva particular e acredita-se que não há nenhuma outra população de *C. echinata* em torno dos 165 km próximos da reserva. Dessa forma, como encontrado por Lemes et al. (2003), em uma população que se mantém isolada, com um número reduzido de indivíduos torna possível a existência de cruzamentos entre indivíduos aparentados e conseqüentemente, a redução da diversidade genética. Assim, o risco de perda de alelos raros pela deriva genética se torna uma questão preocupante, pois esta população retém um alto índice de diversidade genética, mas em função da fragmentação estar bloqueando a troca de genes entre outras populações, a tendência é a perda de alelos raros e, conseqüentemente, a redução de indivíduos heterozigotos. Com o aumento do número de homozigotos na população, o *fitness* fica comprometido, porque a capacidade de adaptação às condições imposta pelo meio ambiente fica seriamente prejudicada, aumentando as chances de extinção da espécie (LENOMARD, 2002).

Por outro lado, a população da ESPAB apresentou um elevado H_e , mas um H_o significativamente reduzido, o que não era esperado, visto que se trata de uma ampla população natural de aproximadamente 400 anos atrás. Vale ressaltar que, apesar do estudo compreender apenas uma amostra dos indivíduos existentes na reserva, era esperado encontrar uma H_o superior, pois eles representam uma parte significativa da composição genética da população. No entanto, tendo em vista o resultado obtido e de posse do elevado índice de fixação ($F_{IS} = 0,55$) apresentado por esta população, é facilmente aceitável que a baixa H_o é causada pela endogamia que está ocorrendo nesta população. No entanto, é válido considerar alguns relatos históricos e ecológicos sobre a espécie. Acredita-se que a espécie se distribuía desde o RN até o sul RJ, antes da chegada dos portugueses. Entretanto, há forte evidência de que a espécie só se distribuía de forma abrangente no último período de glaciação e, com o fim da época fria e seca, a espécie formou blocos que se mantiveram isolados por florestas úmidas (CUNHA; LIMA, 1992). Se isso realmente aconteceu, é plausível que a espécie detenha uma diversidade genética baixa em alguns fragmentos como relatado por Cardoso et al. (1998) e Lira et al. (2003), assim como ocorreu em *Sophora toromiro*, uma espécie em risco de extinção que detém baixa diversidade dentro das populações (MAUNDER et al., 1999). Provavelmente, essa baixa diversidade se deve ao pequeno número de indivíduos fundadores. Por outro lado, com as análises realizadas neste trabalho foi possível detectar uma ampla heterozigosidade nas populações, indicando que elas derivaram de um maior número de indivíduos existentes no passado correspondente a gerações anteriores.

Considerando a existência de endogamia na população, o que já havia sido sugerido por Cardoso et al. (1998) em outras populações de *C. echinata*, o índice encontrado para população da ESPAB foi excepcionalmente alto ($F_{IS} = 0.55$). Vale ressaltar que esta população representa uma distribuição da espécie que ocorria anteriormente às ações antrópicas que levaram à devastação das populações de pau-brasil no período colonial e à fragmentação severa da Mata Atlântica. Isso é uma evidência favorável à suspeita de formação de blocos de pau-brasil após o final da glaciação, levando ao isolamento populacional. Dessa forma, as populações isoladas (fundadoras das populações atuais) detinham uma diversidade genética alta, no entanto, devido ao sistema reprodutivo e, ou, ao sistema de dispersão da espécie, a taxa de endogamia intrapopulacional está aumentando. No caso do pau-brasil, o sistema reprodutivo é pouco conhecido, no entanto, assim como para outras

espécies arbóreas, acredita-se que a espécie seja alógama. Apesar de ser alógama, a espécie ainda apresenta uma alta taxa de cruzamentos endogâmicos, o que pode ser devido a autofecundação, visto que a espécie apresenta uma flor hermafrodita (TUCKER, 2003), ou ainda a cruzamentos entre indivíduos aparentados. O sistema de dispersão do pau-brasil, conforme relatado por Lira et al. (2003), apresenta-se pouco eficiente em termos de distância, visto que as sementes alcançam cerca de 4 a 5 m da árvore progenitora. Assim, é bem provável que haja a formação de estrutura de família, o que aumenta as chances de cruzamento entre indivíduos aparentados. Conseqüentemente, a diversidade genética diminui drasticamente e sob efeitos da deriva, o risco de erosão genética da espécie aumenta consideravelmente. O efeito capaz de minimizar este risco é o fluxo gênico, um fator evolutivo responsável pela homogeneização das populações, restringindo os efeitos da deriva genética e seleção. O que está em concordância com Lira et al. (2003), o fluxo gênico aparente entre as duas populações foi baixo (0,70). Esse resultado era esperado, dado que a distância entre as populações é de aproximadamente 165 km, sendo pouco provável a existência de troca gênica entre populações tão distantes. Segundo ELLSTRAND; ELAM (1993), a troca de um migrante por geração evita forte diferenciação entre duas populações. No entanto, como estas populações encontram-se isoladas, é justificável a forte diferenciação entre elas.

Neste trabalho foram consideradas duas medidas de estruturação genética (F_{ST} e R_{ST}) e as duas populações apresentaram elevados coeficientes de coancestralidade dentro delas ($F_{ST} = 0,31$ e $R_{ST} = 0,26$). Em outros estudos com espécies arbóreas (White et al., 1999; AL-RABAB'AH; WILLIAMS, 2001), foram encontrados coeficientes de coancestralidade inferiores a 0,25, que é o valor correspondente a famílias de irmãos completos (FALCONNER; MACKAY, 1996). No entanto, o resultado obtido para *C. echinata* está de acordo com o modelo de isolamento por distância proposto por Wright (1943). Segundo este modelo, quanto maior a distância entre as populações, mais restrita é a dispersão de pólen e sementes, levando ao isolamento das populações e, conseqüentemente, ao aumento do número de indivíduos proximamente relacionados dentro das populações e também ao aumento da divergência genética entre as populações por deriva. Neste caso, as populações remanescentes estão distantes entre si, aproximadamente, 165 km e, considerando que a polinização do pau-brasil seja

efetuada por abelhas, como sugerido por Zaia (2004), e sabendo da curta distância que estes insetos alcançam, o fluxo de pólen é realmente restrito. Além disso, a dispersão de sementes, no caso do pau-brasil, que é do tipo explosiva também restringe a dispersão dos indivíduos, pois alcança até 5m da árvore mãe, e a espécie não apresenta eventos secundários de dispersão eficientes.

O índice de fixação médio dentro das duas populações ($F_{IS} = 0,387$) indicou a presença de um grande número de homozigotos, possivelmente decorrente de cruzamentos entre indivíduos aparentados. O alto nível de endogamia (F_{IT}) decorre tanto do efeito do sistema de cruzamento (F_{IS}) quanto da deriva genética por causa da subdivisão (F_{ST}).

A análise comparativa entre o grupo de indivíduos adultos e o de regenerantes da população de S. Teimoso demonstrou altas estimativas de diversidade genética, sendo variáveis nos diferentes estádios de vida. Os indivíduos adultos apresentaram maior número de heterozigotos do que os regenerantes, permitindo sugerir que tenha ocorrido alguma seleção contra homozigotos na população adulta e, ou, que esteja ocorrendo autofecundação na população adulta, o que resulta em progênies mais homozigotas. Além disso, pode-se supor que os adultos atuais tenham-se originado a partir de uma troca alélica mais efetiva e com maior número de pais, o que explicaria sua maior heterozigosidade. Acredita-se que a alta heterozigosidade presente nos adultos deve-se ao potencial adaptativo necessário para que a espécie aumente suas chances de sobrevivência no meio, favorecendo a manutenção desses indivíduos heterozigotos. Uma maior proporção de heterozigotos para população de plantas em relação a outras dos diferentes estádios do ciclo de vida já foi encontrado para outras espécies (RIBAS, 2003; CONTE, 2004). Pode-se hipotetizar que os regenerantes resultem de endogamia mais intensa do que os adultos por causa do florescimento desigual exibido pelo pau-brasil, principalmente nas formações florestais atuais, visto terem florescimento supra-anual o que inviabiliza o fluxo de pólen entre os indivíduos. Assim, este fato se torna mais agudo nos indivíduos mais jovens por causa da fragmentação que compromete a movimentação gênica. A presença de alelos privados tanto na população adulta quanto nos regenerantes, ressalta a importância em considerar indivíduos das duas categorias ao desenvolver estratégias de conservação da população. Além disso, a diferenciação genética observada nesta população foi de 0,15, sendo superior ao esperado para progênies de meio-irmãos (0,125),

evidenciando um alto grau de parentesco dentro da população. A causa disso pode ser a vida longa dessa espécie, levando à sobreposição de gerações, que promove o cruzamento entre indivíduos aparentados, ou à dispersão a curta distância, favorecendo a geração de agregados de progênies de irmãos completos.

O entendimento da estrutura genética das espécies existentes nos fragmentos florestais remanescentes é fundamental para a escolha correta das estratégias de manejo e conservação a serem empregadas. Espécies com ampla distribuição geográfica freqüentemente desenvolvem populações adaptadas localmente que, na maioria das vezes, são geneticamente distintas (FUTUYMA, 1992). Possivelmente foi o que aconteceu com as populações naturais de pau-brasil num passado recente. Após o fim da época glacial, as populações se restringiram às pequenas áreas secas. Porém, este fenômeno se acentuou com o avanço do desmatamento florestal ocasionado pela exploração colonial e pela superexploração humana da Mata Atlântica, promovendo redução no número e tamanho das populações, o que deve ter causado deriva e isolamento, cujas forças promoveram aumento na diferenciação das populações. Contudo, o fluxo gênico restrito entre as populações restantes acarreta em erosão genética, aumentando as chances de extinção da espécie. Deste modo, o tamanho efetivo populacional torna-se de fundamental importância, para conservação da espécie, pois ressalta numericamente a diversidade genética existente nas populações e fornece valores exatos de manejo da espécie.

5.3. Tamanho efetivo populacional

O tamanho efetivo populacional (N_e) é uma informação importante para o estudo de estrutura genética das populações e para o delineamento de estratégias eficientes de conservação. A manutenção de um tamanho efetivo adequado diminui a probabilidade de ocorrência das oscilações genéticas e da endogamia (CONTE, 2004). Quanto maior o tamanho efetivo menor será a magnitude da deriva genética.

Em muitos trabalhos têm-se demonstrado que o tamanho efetivo é inferior ao tamanho censo amostrado. Concordantemente, o N_e encontrado para as duas populações de *C. echinata* analisadas foi inferior ao tamanho amostrado. Mesmo assim, evidencia uma elevada diversidade genética presente nestas populações e

revela a necessidade de conservar um grande número de indivíduos para manter esta diversidade. Como a variabilidade não se concentra em uma única população e nem em poucos indivíduos, as estratégias de conservação devem privilegiar ambas as populações e um número elevado de árvores. No intuito de preservar a população de *S. Teimoso*, seria necessário incluir 38,26 (= 38) dos 44 indivíduos catalogados na Reserva para amostrar toda diversidade presente nesta área, por outro lado, visando conservar a população da ESPAB seria necessário conservar 33,9 (= 34) indivíduos dos 54 amostrados para abranger toda a diversidade amostrada. Essa abordagem comprova numericamente a necessidade de conservar a riqueza genética das diferentes populações, visto que elas estão sob constante risco de extinção e estão representadas por muitos indivíduos particularmente.

Do mesmo modo, a fim de conservar uma população natural e manter sua diversidade é necessário obter um N_e de 500 indivíduos (HEDRICK; MILLER, 1992). Dessa forma, para espécie aqui estudada, seria necessário conservar 262 populações, para preservar um número efetivo da diversidade genética da espécie. Esta conservação poderia ser realizada por meio de estocagem de sementes, pois assim seria possível manter toda a representatividade genética da espécie, ou também poderia ser conservado naturalmente, mas certamente nem todas as populações seriam mantidas, principalmente em função da pouca disponibilidade de mata atualmente.

5.4. Análise de parentesco

Na análise de parentesco, um único parental pôde ser determinado para quinze regenerantes com uma probabilidade de maternidade-paternidade superior a 0,80 ($p = 0,01$), e com um mínimo de sete locos analisados. Considerando que o número de locos analisados está dentro do recomendado (CIAMPI, 1999), e a precisão com a qual os indivíduos foram genotipados, estes resultados tornam-se significativamente diferente do esperado. Considerando-se que, segundo Lira et al. (2003), as sementes alcançam até 5 m da mãe, todos os regenerantes foram coletados próximos do suposto genitor, distante de 4 até 12 m. Portanto, esperava-se que fosse possível determinar um grande número de prováveis genitores, e identificar uma estrutura de família. No entanto, o resultado demonstrou que alguns

indivíduos não se encontram próximos do suposto genitor, e sim, que eles alcançam distâncias superiores 1 km. Esses resultados de parentesco permitem sugerir que, apesar de acreditar que o tamanho amostrado dos adultos tenha sido o censo, pode ser que existam na região alguns adultos não coletados, visto que a área se encontra em uma serra, dificultando abranger todos os possíveis locais de ocorrência da espécie. Caso essa hipótese seja verdadeira, ela explicaria a existência de adultos não amostrados, que, possivelmente, estão deixando descendentes em grandes proporções, por apresentarem um sucesso reprodutivo superior ao das árvores amostradas. Dessa forma, justifica a ocorrência de um grande número de progênies com nenhum parental identificado.

Por outro lado, pode-se sugerir também a existência de um possível banco de plântulas da espécie no local, formado por indivíduos adultos que existiram no local em um passado recente. Por exemplo, como se trata de um local com afloramentos rochosos (solos rasos), pode ser que árvores grandes de pau-brasil tenham sido arrancadas por vendavais, como observado em anos recentes no local. Esta hipótese está de acordo com alguns estudos realizados em fragmentos florestais do estado do Rio de Janeiro citados por Lima (2002), nos quais observou-se que o pau-brasil é uma espécie de crescimento lento, embora existam diferenças relacionadas com a região e com o fato de se tratar de uma planta cultivada ou de um exemplar nativo. Além disso, sugerem que as taxas de sobrevivência e de mortalidade das plântulas variam conforme as condições naturais. Locais onde a disponibilidade de luz é mais alta, como clareiras ou trechos impactados nos bordos da floresta, revelam taxa de mortalidade menor e maior número de plântulas. Isso é um indício de que a intensidade da luz em alguns lugares mais abertos da floresta influencia positivamente as taxas de crescimento do pau-brasil (LIMA, 2002). Assim, a ocorrência de um banco de plântulas da espécie pode realmente estar ocorrendo na S. Teimoso. Do mesmo modo, CIAMPI (1999), constatou que muitos regenerantes amostrados próximos da suposta árvore mãe, não tiveram a confirmação de maternidade, justificando os resultados por formação de um banco de plântulas e até mesmo de sementes. No caso do pau-brasil, a formação de um banco de sementes também pode ter ocorrido, com uma menor probabilidade, visto que as sementes são ortodoxas, podendo permanecer por até 18 meses viáveis a uma baixa temperatura. Adicionalmente, o sistema de polinização do pau-brasil, ainda não é conhecido detalhadamente, mas acredita-se que a espécie seja preferencialmente

alógama, sendo polinizada por abelhas, visto que outras espécies do mesmo gênero são polinizadas por estes insetos (LIMA, 2002), e a flor do pau-brasil apresenta uma cor, tamanho, e morfologia de que são típicos de estratégias adotadas pelos vegetais alógamos para atrair polinizadores (ZAIA, 2004). No entanto, em um trabalho desenvolvido por Lira et al. (2003) foi encontrado um baixo fluxo de pólen, e a razão talvez esteja relacionada com o isolamento populacional ocorrido desde o último período de glaciação que ocasionou a formação de blocos em lugares onde eram mais propícios para a manutenção da espécie. Somado a isso, ainda ocorreu a intensa devastação no período colonial que reduziu a espécie a fragmentos restritos de Mata Atlântica. Para ocorrer movimentação de pólen é necessário que haja uma proximidade mínima entre os indivíduos. A probabilidade de haver este tipo de dispersão em áreas fragmentadas é muito pequena, mesmo havendo uma intermediação de insetos polinizadores. Nestes casos, é recomendado que introduza corredores ecológicos a fim de facilitar o deslocamento dos polinizadores. Dessa forma, com uma polinização ocasional associada com uma dispersão explosiva, pode-se considerar que há um fluxo restrito, o qual implica na formação de um banco de plântulas (PIÑA-RODRIGUES et al., 1990).

Os resultados também demonstraram o alcance das sementes dispersas a partir da árvore mãe, evidenciando a existência de dispersão até 1,300 m da árvore mãe. A maioria das progênes se localiza próximas à árvore mãe, como constatado por Lira et al. (2003), no entanto a dispersão a longas distâncias também pode existir. Além disso, pode-se supor que estas sementes poderiam ter sido dispersas por animais, no entanto, acredita-se que a presença de acúleos inviabiliza a dispersão secundária das sementes, evitando o ataque de predadores, como periquitos e maritacas (BUENO, 2002). Dessa forma, o fluxo que ocorreu a longa distância, deve ter ocorrido por causa do movimento benéfico do vento. Assim, se o fluxo permanecer restrito irá influenciar a estrutura genética das populações, além de restringir sua distribuição espacial.

Alguns genitores apresentaram maior sucesso reprodutivo em relação aos outros, o que pode está relacionado ao maior vigor híbrido dos seus alelos ou também pode ser por causa de uma vantagem na localização geográfica que favoreça a polinização e a dispersão de suas sementes.

Esta análise demonstrou a precisão obtida a partir dos dados microssatélites na discriminação genética dos indivíduos necessária para investigação da

paternidade. Para este tipo de análise, quanto maior número de locos, maior é a confiabilidade nos resultados. Com a bateria de sete a dez locos empregados neste estudo, os resultados tornaram-se mais precisos, pois a possibilidade exclusão estar errada diminuiu consideravelmente. Assim, considerando a importância de uma ampla bateria de locos Gaiotto et al. (2003), analisando a paternidade de indivíduos de *E. edulis* utilizando 18 locos, enquanto Ciampi (1999) estudando *Copaíba langsdorffii* aplicou oito locos para investigar a relação de parentesco desta espécie. Entretanto, alguns trabalhos já foram realizados com um número inferior de locos, como a análise realizada com *Symphonia globulifera* por Aldrich et al. (1998), onde foram utilizados apenas três locos. O número limitado de locos empregados na análise de paternidade compromete a confiabilidade na determinação de exclusões e tende a superestimar o número de descendentes para os quais a maternidade ou paternidade é declarada.

Essas análises em plantas naturais permitem verificar mudanças genéticas nas populações ao longo das gerações. Assim, contribui para identificar os fatores evolucionários que influenciam o desenvolvimento e a manutenção da estrutura genética, contribuindo para elaboração de estratégias de conservação da espécie.

6. CONCLUSÕES

1. Dez dos 26 *primers* microssatélites previamente desenhados foram padronizados e apresentaram uma média de 11,6 alelos por loco, com amplitude alélica estimada entre 90 pb (CE 07) a 290 pb (CE 02) e as temperaturas de anelamento foram 56 °C para o CE 02, 63 °C para CE 23 e CE 26 e 59 °C para os demais.
2. As populações naturais de *C. echinata* encontram-se fragmentadas e em forte processo de diferenciação genética, sendo necessário conservar um número efetivo de indivíduos de pelo menos 34 na ESPAB e 38 na S. Teimoso para preservar a diversidade genética amostrada entre plantas adultas. Ambas possuem banco de plântulas, porém é mais numeroso na S. Teimoso.
3. As duas populações mantêm uma alta heterozigosidade gênica ($He = 0,59$ na ESPAB e $He = 0,63$ na S. Teimoso), mas apresentam uma tendência ao excesso de homozigotos ($Ho = 0,24$ na ESPAB e $Ho = 0,53$ na S. Teimoso), evidenciada pelo elevado índice de endogamia, principalmente na população da ESPAB. O índice de coancestralidade intrapopulacional ($F_{ST} = 0,313$; $R_{ST} = 0,262$) foi superior ao esperado para famílias de irmãos completos. Estes índices também indicam uma forte diferenciação interpopulacional. Foi observada maior heterozigosidade nos adultos ($Ho = 0,53$) do que nos indivíduos regenerantes ($Ho = 0,37$) na população da S. Teimoso, com diferenciação entre os dois subgrupos ($F_{ST} = 0,15$) e uma coancestralidade superior ao encontrado para populações de meio-irmãos.
4. O fluxo gênico estimado por F_{ST} entre as duas populações foi menor que 1, sendo considerado insuficiente para minimizar os efeitos da deriva e seleção que vêm ocorrendo nessas populações desde épocas anteriores à colonização e foram intensificadas pelo processo de fragmentação da Mata Atlântica. O fluxo

estimado pela análise de parentesco na população da *S. Teimoso* demonstrou a dispersão de sementes a distâncias superiores a 1 km da árvore mãe, antes não reportado para pau-brasil, e a existência de alelos privativos da população regenerante, indicando a formação de banco de plântulas por indivíduos de gerações anteriores.

5. Os parâmetros genéticos obtidos confirmam a necessidade de conservar a espécie e dão subsídios numéricos para elaborar estratégias de conservação. Para evitar a erosão genética, medidas de conservação *in situ* que considerem a necessidade de troca gênica devem ser tomadas, como por exemplo, a conexão entre populações fragmentadas e o aumento de áreas destinadas à conservação. Além disso, estabelecer coleções *ex situ* de sementes para conservar as 262 populações recomendadas para manter a diversidade genética da espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, F.F.A.; PINHO, R.A. Pau- Brasil: *Caesalpinia echinata* Lam. 2 ed. **Instituto de Botânica**, São Paulo. Folheto 18, 1996.

AGUIAR, F.F.A.; BARBOSA, J.M. Estudo de conservação e longevidade de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Ecosystema**, n. 10, p. 145-150, 1985.

AKKAYA, M.S.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. **Crop Science**, v. 35, n. 5, p. 1439-1445, 1995.

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

AL-RABAB'AH; WILLIAMS, M.A.; WILLIAMS, C.G. Population dynamics of *Pinus taeda* L. based on nuclear microsatellites. **Forest Ecology and Management**, v. 163, p. 263-271, 2002.

ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: Matioli, Sergio Russo (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos. 2001. 202p.

ATHERLY, A.G.; GIRTON, J.R.; McDONALD, J.F. **The science of Genetics**. Fort Worth: Harcourt College Publisher, 1999, 704p.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. New York: Chapman e Hall, 2004. 511 p.

BALLAL, S.R.; FORÉ, S.A. GUITTMAN, S.I. Apparent gene flow e genetic structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, p. 1311-1314, 1994.

BARBEDO, C.J., BIBLIA, D. A. C.; FIGUEIREDO - RIBEIRO, R.C L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie ameaçada da Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 4, p. 431-439, 2002.

BAWA, K.S. Effects of deforestation and forest fragmentation on genetic diversity in tropical tree populations. In. **Proceedings of International Symposium on Genetic Conservation and Production of tropical Forest Tree Seeds**, p. 10-16. Asean-Canada Forest Tree Seed Project, Muak-lek, 1994.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos Genes nas Famílias e nas Populações**. 2 Ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 460 p.

BOSSART; PROWELL, J.L.; PROWELL, D. P. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. **Tree**, v. 13, p. 202-206, 1998.

BOTANIC GARDENS CONSERVATION INTERNATIONAL. **Normas internacionais de conservação para jardins botânicos**. Rio de Janeiro: Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede Brasileira de Jardins Botânicos/Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC, 2001.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA., D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical Applied Genetics**, v. 97, p. 816-827, 1998.

BRONDANI, R.P.V.; GAIOTTO, F.A.; MISSIAGGIA, A.A.; KIRST, M.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA., D. Microsatellite markers for *Ceiba petandra* (Bombaceaea), an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 177-179, 2003.

BROWN, A.H.D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 52, p. 145-157, 1978.

BROWN, S, M et al. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 39, n. 1-2, p. 190-198, 1996.

BUENO, E. Nova viagem à terra do Brasil. In: Eduardo Bueno. **Pau-Brasil**. São Paulo: Axis Mundi, 2002. p. 39-76.

CARDOSO, M.A.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P.C.G.; OLIVEIRA, D.E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, v. 7, p. 601-608, 1998.

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

CHASE, M.R.; BOSHIER, D.H.; BAWA, K.S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. Genetic variation in natural populations. **American Journal of Botany**, v. 82, p. 468-475, 1995.

CHASE, M.R.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, v. 83, p. 51-57, 1996b.

CIAMPI, A.Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e seqüenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de Copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado.** 1999. 204 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 1999.

COART, E. et al. Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 845-857, 2003.

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

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 349-356, 2001.

CONDITT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of 2-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, v. 34, p. 66-71, 1991.

CONTE, Rudimar. **Estrutura Genética de populações de *E. edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites.** 2004, 135 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CREGAN, P.B. et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v. 39, p. 1464-1490, 1999.

CRUZ- SILVA, I. et al. A proteinase inhibitor from *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) seeds for plasma kallikrein, plasmin and factor XIIa. **Biological Chemical**, 385, v. 11, p. 1083-1086, 2004.

CUNHA, M.; LIMA, H.C. **Viagem à Terra do Pau Brasil.** 1 ed. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura, 1992.

DAYANANDAN, S; BAWA, K.S.; KESSELI, R. Conservation of microsatellite among tropical tree (Leguminosae). **American Journal of Botanical**, v. 84, p. 1658-1663, 1997.

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1585-1592, 1999.

DEAN, W. **A ferro e fogo**. 2ed. Rio de Janeiro: Companhia das Letras, 1996.

DOW, B.D & ASHLEY, M.V. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 615-627, 1996.

ELLSTRAND, N.C. and DEVLIN, B. The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. **Evolution**, v. 44, n. 2, p. 248-259, 1990.

ELLSTRAND, N.C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. **Annual Review Ecology Systematics**, v. 24, p. 2170-242, 1993.

FALCONER, D.S. & MACKAY, T.F.C. **Introduction to Quantitative Genetics**. 4 ed. England: Longman, 1996. 464 p.

FRANKHAM, R. Quantitative genetics in conservation biology. **Genetic Research Camb.**, v. 74, p. 237-244, 1999.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Compters Rendus Biologies**, v. 326, p. 22-29, 2003.

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

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992, 613 p.

GAIOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *E. oleraceae* Mart. (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 86-88, 2001.

GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOSKY, R. Genetic Structure, Mating System, and Long-Distance Gene Flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, v.94, n.5,p. 399-406, 2003.

GANDARA, F.B. et al. Towards the development of genetic and ecological parameters for *in situ* conservation of forest genetic resources. In: International Workshop on Biodiversity Monitoring in Federal Protected Areas, xx, 1997, local. **Resumos ...**, 1997, p. 95-110.

GANDARA, P. Y.; KAGEYAMA, P. Y. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **IPEF**, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

GILLIES, A.C.M.; CORNELIUS, J.P.; NEWTON, A.C. et al. Genetic variation in Costa Rican population of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 1133-1145, 1997.

GOLDSTEIN, D. B.; LINARES, A. R.; CAVALLI-SFORZA, L.L. and FELDMAN, M. W. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. **Genetics**, v. 139, p. 463-471, 1995.

GOODMAN, S.J. Rst Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 881-885, 1997.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucaliptus* como exemplo. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.(Ed.) **Recursos Genéticos e Melhoramento: Plantas**. Rondonópolis, Fundação MT, 2001, p. 967-994.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOKS, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, v. 39, p. 439-446, 1974.

GUPTA, P. K. et al. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. **Current Science**, v. 70, n. 1, p. 45-54, 1996.

HABERL, M; TAUTZ, D. Comparative allele sizing can produce inaccurate allele size differences for microsatellites. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1347-1350, 1999.

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 79, p. 6465-6469, 1982.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetics variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD – COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRIDE, B.; THOMAS, S.L. (Ed.) **Genetics and Conservation**. Menlo Park: The Benjamin/Cumming Publishing Company, 1983. p. 335-348.

HAMRICK, J.L.; SCHNABEL, A. Understanding the genetic structure of plant populations: Some old problems and a new approach. In: Gregorios, H.R. (Ed) **Lecture notes in Biomathematics: populations genetics in forestry**, 1985. p. 50-70.

HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. Isoenzyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica**, v. 18, p. 201-207, 1986.

HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. In: (eds Bock, J.H.; Linhart, Y.B.) **The evolutionary ecology of plants**. Boulder: Westview Press, 1989. p. 129-146.

HAMRICK, J.L. Isozymes and analysis of genetic structure in plants populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S (Ed). **Isozyme and analysis of genetic structure in plant population**. London: Chapman and Hall, 1989, p.335-348.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In. (eds Brown AHD, Clegg M.T.; Kahler, A.L.; Weir, B.S.) **Plant Populaton Genetics, Breeding and Genetic Resources**,. Massachusetts: Sinauer, 1990, p. 43-46.

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

HARTL, D. L. **A primer of population genetics**. 3 Ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2000, 219 p.

HEDRICK, P.W. MILLER, P.S. Conservation genetics: techniques and fundamentals. **Ecology Applied**, v. 2, p. 30-46, 1992.

JOLY, C. A. et al. Evolution of the Brazilian phytogeography classification systems: implications for biodiversity conservation. **Ciência e Cultura**, v.51, p. 331-348, 1999.

JUCHUM, F.S., AMORIM, A.M., CORRÊA, R.X. Análise filogenética dos variantes morfológicos foliares de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) da região sul baiana com bases em seqüências de DNA. In: Congresso Nacional de Genética, 51, 2005, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...**, Ribeirão Preto: SBG, 2005.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG E. A.; et al. Plant systematic phylogenetic approach. Sinauer Associates, p. 283- 288, 1999.

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular Techniques in the Assesment of Botanical Diversity. **Annals of Botany**, v. 78, p. 143-149, 1996.

LEMES, M. R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 2875-2883, 2003.

LENORMAND, T. Gene flow and the limits to natural selection. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 17, p.183-189, 2002.

LEWIS, G.; GIBBS, P. Reproductive biology of *Caesalpinia calycina* and *C. pluviosa* (Leguminosae) of the caatinga of north-eastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 217, p. 43-53, 1999.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data**. Version 1.0. Disponível em <<http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/> , 2000>. Acesso em: 15 maio 2005.

LEWONTIN, R.C.; HUBB, J.L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II Amount of variation and degree of

heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 54, p. 595-609, 1966.

LIAN, C. et al. Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 609-618, 2003.

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

LI, Q.; XU, Z.; HE, T. Ex situ genetic conservation of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae) in China. **Biological Conservation**, v. 106, p. 151-156, 2002b.

LIMA, H.C. Aspectos botânicos do pau-brasil. In M.W. Cunha e H.C. Lima (eds.). **Viagem a terra do pau-brasil**. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura, 1992, p. 23-38.

LIMA, H.C. Pau-brasil: uma biografia. In: **Pau-Brasil**. Eduardo Bueno, São Paulo: Axis Mundi, 2002, p. 39-76.

LINN, S.; ARBER, W. Host specificity of DNA produced by *E. coli*. X. In vitro restriction of phage fd replicative form. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, v. 59, p. 1300-1306, 1968.

LIRA, C.F.; CARDOSO, S.R.S.; FERREIRA, P.C.G.; CARDOSO, M.A.; PROVAN, J. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. Revealed by chloroplast microsatellites. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3219-3225, 2003.

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

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

MAINIERI, C. **Estudo macro e microscópico de madeiras conhecidas por pau-brasil**. São Paulo: IPT, Publicação 612, 1960.

MAUNDER, M; CULHAM, A.; BORDEU, A.; ALLAINGUILLAUMES, J.; WILKINSONS, M. Genetic diversity and pedigree for *Sophora toromiro* (Leguminosae): a tree extinct in the wild. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 725-738, 1999.

MELLO-FILHO, L.E. A Floresta Atlântica. In. S. Monteiro & L. Kaz. **Floresta Atlântica/textos científicos**. Rio de Janeiro: Edições Alumbamento, 1991/1992, p. 17-21.

MEFFE, G. K.; CARROLL, C.R. **Principles of Conservation Biology**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. 620 p.

MESELSON, M.; YUAN, R. DNA restriction enzyme from *E.coli*. **Nature**, v. 217, p. 1110-1114, 1968.

MILLER, M. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A windows programs for analyses of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Disponível em: <<http://www.biology.lsu.edu/general/software.html>>. Acesso em: 15 maio 2005.

MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C.A. et al. Application of multiplex PCR and fluorescent-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Science**, n. 37, p. 617-624, 1997.

MELO, S.C.O.; CUPERTINO, F.B.; GAIOTTO, F.A; BEZERRA, J.L; CORRÊA, R.X. Caracterização de populações sul baianas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) por meio de marcadores moleculares. In: Congresso Nacional de Genética, 50, 2004, Florianópolis, SC. **Resumos...**, Ribeirão Preto: SBG, 2004.

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

NEI, M. Genetic distance between populations. **American naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M.; MARUYMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v. 29, p. 1-10, 1975.

NEI, M. F- Statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann. Hum. Genet**, v. 41, p. 225-233, 1977.

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

O' BRIEN, S. J. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 5748-5755, 1994.

O'HANLON, P.C., PEAKALL, R. and BRIESE, D.T. A review of new PCR-based genetic markers and their utility to weed ecology. **Weed Research**, v. 40, p. 239-254, 2000.

OLIVEIRA, L.F.C; EDWARDS, H.G.M.; VELOZO, E.S.; NESBITT, M. Vibrational spectroscopic study of brazilian and brazilin, the main constituents of brazilwood from Brazil. **Vibrational Spectroscopy**, v. 28, p. 243-249, 2002.

OUBORG, N.J.; PIQUOT, Y; GROENENDAEL, J.M. V. Populations genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, v. 87, p. 551-568, 1999.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; COSTA, L.G.S.; REIS, A. Estratégias de estabelecimento das espécies arbóreas e o manejo de florestas tropicais, 6 Congresso Florestal Brasileiro, São Paulo, 1990. **Resumos...**, São Paulo: CFB, 1990.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. **Portaria N. 37-N**, de 3 de abril de 1992, o IBAMA torna pública a Lista Oficial de Espécies de Flora Brasileira Ameaçada de Extinção. IBAMA, 1992.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 215-222, 1996.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina: E. Rodrigues, 2001, 328p.

PRIOLLI, R.H.G.; MENDES-JUNIOR, C.T.; ARANTES, N.E.; CONTEL, E.P.B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, n. 25, v. 2, p. 185-193, 2002.

RAFALSKY, J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W; ANDRE, C.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B; LAI, E. **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. Orlando: Academic Press, p. 75-134, 1996.

RAMALHO, R.S. **Pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.)**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Boletim de Extensão, n. 12, p. 1-11, 1978.

RIBAS, L.A. **Diversidade Genética e Sistema de Cruzamento em duas espécies pioneiras arbóreas**. Piracicaba, 2003, 102 f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2003.

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. Manual de Dendrologia Brasileira. E. Blucher, São Paulo, 1971. 294 p.

ROCHA, Y.T. Conservação do Pau-Brasil. **Anais do XV Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo**, Ubatuba, SP, 2004.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: Alfenas A.C. (Ed) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: **Fundamentos e Aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998, p. 329-380.

ROSSETO, M; SLADE, R.W., BAVERSTOCK, P. R.; HENRY, R. J.; LEE, L.S. Microsatellite variation and assessment of genetic structure in tea tree (*Melaleuca alternifolia* – Myrtaceae). **Molecular Ecology**, v. 8, p. 633- 643, 1999.

SCARIOT, A. Forest fragmentation effects on palm diversity in central Amazonia. **Journal of Ecology**, v. 87, p. 66-76, 1999.

SCHIERENBECK, K.A.; SKUPSKI, M.; LIEBERMAN, D.; LIEBERMAN, M. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 137-144, 1997.

SCHMITT, T. and SEITZ, A. Influence of habitat fragmentation on the genetic structure of *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 107, p. 291-297, 2002.

SCHNABEL, A. and HAMRICK, J.L. Understanding the population genetic structure of *Gleditsia Triacanthos* L.: the scale and pattern of pollen gene flow. **Evolution**, v. 49, p. 921-931, 1995.

SEAL, U. S. Tecnologia intensiva no cuidado de populações *ex situ* de espécies em extinção. In: Wilson, E.O. (Ed.). **Biodiversidade**, Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997, 657 p.

SEBBENN, A. M. et al. Variação Genética entre e dentro de populações de amendoim – *Pterogyne nitens*. **Scientia Forestalis**, n. 56, p. 29-40, 1999.

SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y; SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, n. 57, p. 123-139, 2000.

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

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, p. 787-92, 1987.

SOARES, C.M.C. **Pau-Brasil: a árvore nacional**. 2 ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco/Estação Ecológica do Tapacurá, 1985.

SOULÉ, M. What is conservation biology? **BioScience**, v. 35, p. 727-734, 1985.

SORK, V. L.; NANSON, J.; CAMPBELL, D.R.; FERNANDEZ, J.F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. Trends in **Ecology & Evolution**, v. 13, n. 5, p. 219-224, 1999.

SOUZA, A.P. **Biologia Molecular aplicada ao melhoramento**. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.(Ed.) Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p. 939-966.

TABARELLI, M., MANTOVANI, W.; PERES, C.A. Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biological Conservation**, v. 91, p. 119-127, 1999.

TACHIDA, H.; IIZUKA, Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. **Genetics**, v. 131, p. 471-478, 1992.

- TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics e Development**, v. 4, p. 832-837, 1994.
- TEMPLETON, A.R.; SHAW, K.; ROUTMAN, E; DAVIS, SK. The genetic consequences of habitat fragmentation. **Annals of the Missouri Botanical Gardens**, v. 77, p. 13-27, 1990.
- THOMAS, W. W. The Atlantic Coastal Forest of Southern Bahia, Brazil. **Plant Talk**, v. 24, p. 21-25. 2001.
- TUCKER, S.C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**, v. 131, p. 911-926, 2003.
- TRAVER, M. Numeric statements of the strenght of the genetic evidence. In: **Parentage Testing Accreditation Requirements Manual**. American Association of Blood Banks. 3 Ed, 1998.
- VENCOSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. **IPEF**, v. 35, p. 79-84, 1987.
- VENCOSKY, R and CROSSA, J. Measurements of Representativeness Used in Genetic Resources Conservation and Plant Breeding. **Crop Science**, v. 43, p. 1912-1921, 2003.
- WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 1-8, 1994.
- WANG, X.W.; KAGA, A.; TOMOOKA, N.; VAUGHAN, D.A. The development of SSR markers by a new method in plants and application to gene flow studies in azuki bean (*Vigna angularis* (Wilid.) Ohwi & Ohashi). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 352-360, 2004.
- WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis II**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G. KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WILSON, E.O. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 657 p.
- WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1899-1909, 1999.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p. 114-138, 1943.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.

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

WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of populations**. Vol 2. The theory of gene frequencies. Chicago: University of Chicago Press, 1969, 511 p.

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

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting, 1993. **European Patent Application**, n. 0534858 A1, 1993.

ZAIA, H.A.B.A. **Desenvolvimento floral de *C. echinata* Lam, *C. peltophoroides* Benth e *C. férrea* Var. *leyotachia* Benth (Fabaceae/ Caesalpinioideae)**. 2004, 53 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ZAWKO, G.; KRAUSS, S.L.; DIXON, K.W.; SIVASITHAMPARAM, K. Conservation genetics of the rare and endangered *Lecopogon obtectus* (Ericaceae). **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2389-2396, 2001.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R.P. V.; PINHEIRO, J.B. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Ecology**, v. 26, p. 449-457, 2003.